

# Mikrobiologische Qualitätsparameter und Nachweis der Erhitzung von Konsummilch verschiedener Herstellungsarten

---

**Marco Kratz**



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
Professur für Milchwissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

**Mikrobiologische Qualitätsparameter und Nachweis der  
Erhitzung von Konsummilch verschiedener Herstellungsarten**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Marco Kratz**

Tierarzt aus Gießen

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

---

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der Disputation: 04.06.2014

*Hanne*



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Milch .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Definition von Milch .....	3
2.1.2 Rohmilch.....	3
<b>2.2 Milchbearbeitung.....</b>	<b>4</b>
2.2.1 Reinigung .....	4
2.2.2 Thermisierung.....	4
2.2.3 Entrahmung .....	4
2.2.4 Fettstandardisierung.....	6
2.2.5 Homogenisierung .....	6
2.2.6 Pasteurisation und Ultrahocherhitzung .....	9
<b>2.3 Pasteurisierte Milch – traditionell hergestellt.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Pasteurisierte Milch - ESL-Milch.....</b>	<b>12</b>
2.4.1 Herstellung und Eigenschaften von ESL-Milch .....	12
2.4.2 Wirtschaftliche Bedeutung von ESL-Milch in Deutschland .....	18
2.4.3 Herstellungsverfahren von ESL-Milch in Deutschland .....	19
2.4.3.1 Hoherhitzung .....	19
2.4.3.2 Mikrofiltration .....	25
2.4.3.3 Tiefenfiltration .....	31
2.4.3.4 Baktofugation.....	33
<b>2.5 UHT-Milch.....</b>	<b>37</b>
<b>2.6 Abfüllung/Kühlung .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7 Mikrobiologische Qualitätsparameter .....</b>	<b>41</b>
2.7.1 Coliforme Bakterien .....	41
2.7.2 <i>Escherichia coli</i> .....	44
2.7.3 Gesamtkeimzahl.....	48

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Probenmaterial .....	49
3.1.2	Nährböden und Reagenzien .....	51
3.1.3	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial .....	52
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>54</b>
3.2.1	Probenahme .....	54
3.2.2	Spezifische Untersuchungsverfahren.....	54
3.2.3	Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl .....	56
3.2.4	Quantitative Bestimmung von <i>E. coli</i> und coliformen Keimen.....	57
3.2.5	Nachweis des Enzyms alkalische Phosphatase .....	58
3.2.6	Nachweis des Enzyms Lactoperoxidase .....	60
3.2.7	Statistische Verfahren .....	61
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen ohne vorherige Inkubation .....</b>	<b>63</b>
4.1.1	Nachweis des Enzyms alkalische Phosphatase .....	63
4.1.2	Nachweis des Enzyms Lactoperoxidase .....	63
4.1.3	Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl .....	64
4.1.4	Untersuchung auf das Vorhandensein von <i>E. coli</i> und coliformen Keimen .....	67
4.1.5	pH-Wert-Messung .....	68
<b>4.2</b>	<b>Zusatzuntersuchungen nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C .....</b>	<b>69</b>
4.2.1	Nachweis des Enzyms alkalische Phosphatase .....	69
4.2.2	Nachweis des Enzyms Lactoperoxidase .....	69
4.2.3	Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl .....	69
4.2.4	Untersuchung auf das Vorhandensein von <i>E. coli</i> und coliformen Keimen .....	72
4.2.5	pH-Wert-Messung .....	72
<b>4.3</b>	<b>Zusatzuntersuchungen nach 6-tägiger Lagerung bei 21 °C .....</b>	<b>73</b>
4.3.1	Nachweis des Enzyms alkalische Phosphatase .....	73
4.3.2	Nachweis des Enzyms Lactoperoxidase .....	73
4.3.3	Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl .....	73
4.3.4	Untersuchung auf das Vorhandensein von <i>E. coli</i> und coliformen Keimen .....	74
4.3.5	pH-Wert-Messung .....	74
<b>4.4</b>	<b>Methodenvergleich einer TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung und Traventol<sup>®</sup> .....</b>	<b>75</b>



<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>78</b>
5.1	Verwendung von TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Substratlösung als Alternative zum Traventol®-Reagenz.....	79
5.2	Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl in Konsummilch.....	79
5.3	Vergleich von ESL-MF- und ESL-HE-Milch.....	80
5.4	Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden.....	82
5.5	Lagerung bei 21 °C für 6 Tage.....	83
5.6	pH-Werte.....	83
5.7	Vergleich zwischen ökologischer und konventioneller Herstellungsweise.....	83
5.8	<i>E. coli</i> und coliforme Keime in Konsummilch .....	83
5.9	Schlussfolgerungen .....	84
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>111</b>
	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>112</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
°F	Grad Fahrenheit
β-LG	Beta-Lactoglobulin
AP	alkalische Phosphatase
DAEC	diffus adherente <i>E. coli</i>
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
eae-Gen	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ESL	Extended Shelf Life
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
EVEC	enterovirulente <i>E. coli</i>
ESL-HE-Milch	hocherhitzte Milch; Erhitzung auf 85 – 127°C bei Heißhaltezeiten im Sekundenbereich
ESL-MF-Milch	mikrofiltrierte und zusätzlich bei Temperaturen von 72 – 75 °C und Heißhaltezeiten 15 – 30 Sekunden pasteurisierte Milch
HTST	High Temperature Short Time
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom

## Abkürzungsverzeichnis

---

KbE	Kolonie bildende Einheiten
KZE	Kurzzeiterhitzung
LEE	locus of enterocyte effacement
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LP	Lactoperoxidase
Lsg.	Lösung
LTH	Low Temperature Holding
LTLT	Low Temperature Long Time
MF	Mikrofiltration
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
MPN	Most Probable Number
n	Anzahl
SLT	Shiga Like Toxin
STEC	Shigatoxin oder Shiga-like-Toxin-bildende <i>E. coli</i>
Stx	Shigatoxin
TF	Tiefenfiltration
TH-HTST-Milch	traditionell hergestellte pasteurisierte Milch (Frischmilch); Erhitzung auf 72 – 75 °C bei Heißhaltezeiten von 15 - 30 Sekunden
TMB	Tetramethylbenzidin
T <sub>opt</sub>	Temperaturoptimum
TTI	Time Temperature Integrator
TTP	thrombozytopenische Purpura

## Abkürzungsverzeichnis

---

UHT	Ultra High Temperature
UHT-Milch	haltbare Milch (ultrahocherhitzte Milch, H-Milch); Erhitzung auf mindestens 135 °C für über eine Sekunde
VTEC	Verotoxin-bildende <i>E. coli</i>

# 1 Einleitung

Milch und Milchprodukte sind ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung. Allerdings ist Rohmilch ein leicht verderbliches und damit kritisches Lebensmittel. Daher ist die Wärmebehandlung von Milch ein bisher unverzichtbarer Schritt zur Haltbarmachung und zum Schutz vor Krankheitserregern.

Mit dem Fortschritt der Lebensmitteltechnologie haben sich in den letzten Jahrzehnten neue Möglichkeiten der Bearbeitung von Milch etabliert, sowohl was die Verfahren der Wärmebehandlung betrifft als auch im Hinblick auf ergänzende oder komplementäre Verfahren zur Erhitzung. So entwickelte die Industrie in den letzten Jahrzehnten neben den herkömmlichen Trinkmilchprodukten wie der pasteurisierten Frischmilch und der H-Milch die ESL (Extended Shelf Life) -Milch, welche in Deutschland bisher besser als sogenannte länger haltbare Frischmilch bekannt ist. Shelf Life bezeichnet hier die Zeitspanne von der Produktion eines Lebensmittels bis zum Ende der Mindesthaltbarkeit (IFT/FDA 2003).

ESL-Milch soll eine Lücke zwischen der sehr schnell verderblichen traditionellen Frischmilch, welche gekühlt nur wenige Tage haltbar ist, und der bei Zimmertemperatur mehrere Monate haltbaren H-Milch schließen, indem es möglichst viele Merkmale der frischen Milch mit einer verlängerten Haltbarkeit kombiniert.

In Nordamerika wird länger haltbare Frischmilch seit den frühen 60er Jahren vermarktet. Dort erreicht ESL-Milch in Folge von Hoherhitzung, steriler Abfüllanlagen und einer sehr gut etablierten Kühlkette mittlerweile eine Haltbarkeit zwischen 45 und 60 Tagen (HENYON 1999; SCHÖNE 2003). Neben den USA und Kanada wird frische Milch unter anderem auch in Großbritannien, Skandinavien, Südkorea, Japan, Australien bevorzugt. Der Anteil an gekühlten Frischprodukten liegt hier bei etwa 90 % (FRAHM u. GRUCHOT 2010), wogegen der Anteil an Frischmilch zum Beispiel in Frankreich und Spanien im niedrigen einstelligen Prozentbereich liegt (FRAHM u. GRUCHOT 2010). Auch in Portugal wird traditionell weit mehr Ultrahocherhitzte- als Frischmilch vermarktet. (RYSSTAD u. KOLSTAD 2006).

In Deutschland liegt der Marktanteil von ESL-Milch an Konsummilchprodukten mittlerweile bei ca. 30%.

Zur Herstellung von ESL-Milch werden verschiedene Verfahren angewendet, die zum Beispiel bezüglich mikrobiologischer Qualitätsparameter und Erhitzungsmarkerenzymen unterschiedliche Auswirkungen auf das Endprodukt haben können.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden im deutschsprachigen Raum zwei Verfahren zur Herstellung von kommerzieller ESL-Milch eingesetzt.

Zum einen die Hoherhitzung, die ohne großen Aufwand in jeder Molkerei, die bisher traditionell hergestellte pasteurisierte Frischmilch oder H-Milch hergestellt hat, durchgeführt werden kann.

Zum anderen die Mikrofiltration, wobei es sich hierbei um ein, zumindest in Europa, relativ neues Verfahren zur Produktion von pasteurisierter Konsummilch handelt.

Ziel dieser Arbeit war es, die mikrobiologische Qualität der verschiedenen Produktionsverfahren anhand der Untersuchung auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl sowie auf das Vorkommen von coliformen Keimen und *E. coli* zu beurteilen. Gleichzeitig sollte ein Verfahren zum Erhitzungsnachweis zur Differenzierung zwischen länger frischer pasteurisierter Milch, bei der zusätzlich zur Pasteurisation das Verfahren der Mikrofiltration eingesetzt wurde, und solcher die ausschließlich mittels Hoherhitzung hergestellt wurde, geprüft werden.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Milch**

#### **2.1.1 Definition von Milch**

Milch ist die von den Milchdrüsen sowohl des Menschen (Frauenmilch, Humanmilch) als auch der Säugetiere ausgeschiedene Flüssigkeit, die dem Neugeborenen als Nahrung dient (TSCHEUSCHNER 2004).

Diese Arbeit bezieht sich ausschließlich auf Kuhmilch und aus Kuhmilch hergestellte Produkte, so dass der Begriff Milch im Weiteren ausschließlich nach folgender Definition verwendet wird:

Milch ist das durch ein- oder mehrmaliges tägliches Melken gewonnene unveränderte Eutersekret von zur Milchgewinnung gehaltenen Kühen (SPREER 2005), ausgenommen Kolostrum.

#### **2.1.2 Rohmilch**

Gemäß Verordnung (EG) Nr. 853/2004 ist Rohmilch das unveränderte Gemelk von Nutztieren, das nicht über 40 °C erhitzt und keiner Behandlung mit ähnlicher Wirkung unterzogen wurde. Dies schließt ein, dass Rohmilch keine Zusatzstoffe zugeführt werden dürfen (COORS 2010).

Die Rohmilchqualität wird beeinflusst von mehreren Faktoren. Zum einen hängt die Milchqualität vom Gesundheitszustand der laktierenden Kühe ab. Vor allem Mastitiden und andere Sekretionsstörungen haben entscheidenden Einfluss auf die Anzahl an somatischen Zellen, auf Enzyme und auf die Mikroflora der Milch.

Des Weiteren unterliegt die Rohmilch während der Lagerung im Betrieb und auf dem Weg vom Milchproduktionsbetrieb zum Milchverarbeitungsbetrieb (Molkerei) weiteren Veränderungen wie zum Beispiel der Kontamination mit Fremdkeimen und Verunreinigungen beim Melken, dem Lagern im Erzeugerbetrieb, dem Transport zur Molkerei (SABOYA u. MAUBOIS 2000) und dort wiederum bei der Lagerung der unbehandelten Milch vor der Verarbeitung (KULOZIK et al. 2009). Um lagerungsbedingte Veränderungen der Milch

einzuschränken, müssen die Lebensmittelunternehmer sicherstellen, dass nach Annahme im Verarbeitungsbetrieb die Milch rasch auf eine Temperatur von nicht mehr als 6 °C gekühlt wird (VERORDNUNG (EG) NR. 1662/2006).

## **2.2 Milchbearbeitung**

### **2.2.1 Reinigung**

Das Reinigen der Milch vor der Bearbeitung kann theoretisch durch Separation (Zentrifugation) oder durch Filtration erfolgen (SPREER 2005). Beim Reinigen werden Partikel wie Schmutz, Staub und zum Teil auch abgestorbene Epithelzellen, Leukozyten, Erythrozyten und Proteinagglomerate mit hohem Keimgehalt entfernt. Um ein ungewolltes Bakterienwachstum zu vermeiden, kann Milch bei 4 °C gereinigt werden (ROSENTHAL 1991). In Deutschland wird die Rohmilch praktisch ausschließlich durch Zentrifugation gereinigt.

### **2.2.2 Thermisierung**

Thermisierte Milch ist Milch, die gereinigt und bei 57 – 68 °C für 15 bis maximal 30 Sekunden mild wärmebehandelt wurde (BELITZ et al. 2001; CLAEYS et al. 2002; SPREER 2005; STRAHM u. EBERHARD 2010). Der Phosphatasetest muss nach einer Thermisierung positiv ausfallen.

Dieser Schritt der Milchbearbeitung wird zum Abtöten thermolabiler Mikroorganismen angewendet, wodurch die Lagerfähigkeit erhöht wird (STRAHM u. EBERHARD 2010). Das Thermisieren ersetzt jedoch keinesfalls die Pasteurisation und thermisierte Milch darf nicht als genussfertige Milch in den Verkehr gebracht werden (STRAHM u. EBERHARD 2010).

### **2.2.3 Entrahmung**

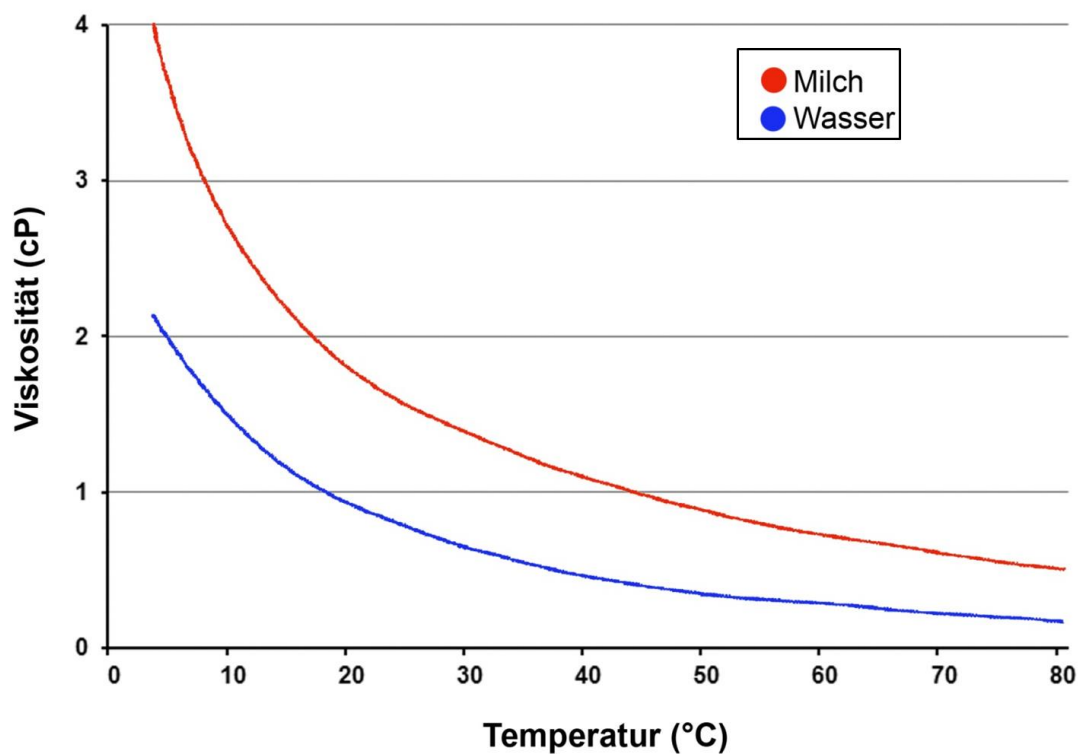
Die mechanische Trennung von Milch in die Anteile Rahm und Magermilch dient dem Einstellen des Fettgehaltes der Milch und ermöglicht zudem die



separate Verarbeitung beider Fraktionen wie sie zum Beispiel in der Herstellung von ESL-Milch benötigt wird.

Die Dichtedifferenz von Magermilch ( $\rho \approx 1,035 \text{ g/cm}^3$ ) und Milchfett ( $\rho \approx 0,93 \text{ g/cm}^3$ ) erlaubt es, das emulgierte Milchfett durch Zentrifugalkräfte mittels Entrahmungsseparatoren abzutrennen (STRAHM u. EBERHARD 2010). Hierbei werden heute Entrahmungsschärfen von 0,005% (SPREER 2005), also eine fast fettfreie Magermilch erreicht.

Das Entrahmen kann direkt mit dem Thermisiervorgang gekoppelt werden, da die Phasentrennung der Milch durch Viskositätserniedrigung (Abbildung 2-1) bei Temperaturen zwischen 50 und 60 °C am besten funktioniert (SPREER 2005; SCHWERMANN und SCHWENZOW 2008a).



**Abbildung 2-1** Zusammenhang zwischen Temperatur und Viskosität bei Milch und Wasser (modifiziert nach RENNER 1987)

#### **2.2.4 Fettstandardisierung**

Fettgehalt von Milch ist definiert als das Verhältnis von Masseteilen Milchfett auf 100 Masseteile der betreffenden Milch (Verordnung (EG) NR. 1234/2007).

Die Fett- und Eiweißgehalte der Rohmilch unterliegen natürlichen Schwankungen, wobei die größte Schwankung beim Fettgehalt zu verzeichnen ist. Hier wird durch gezieltes Rückmischen des Rahmes in die Magermilch der gewünschte Fettgehalt eingestellt (SPREER 2005). Die Einstellung des Proteingehaltes ist mittels Membranfiltrationstechnik (Ultrafiltration) ebenfalls möglich.

#### **2.2.5 Homogenisierung**

Milch ist ein Gemisch aus Wasser und den darin fein verteilten Inhaltsstoffen, die in unterschiedlichem Ausmaß Struktureinheiten ausbilden. Mit bloßem Auge betrachtet erscheint Milch als homogene Flüssigkeit, aber schon beim Betrachten unter dem Mikroskop ist das enthaltene Fett in Form von Fettkügelchen sichtbar (TÖPEL 2004).

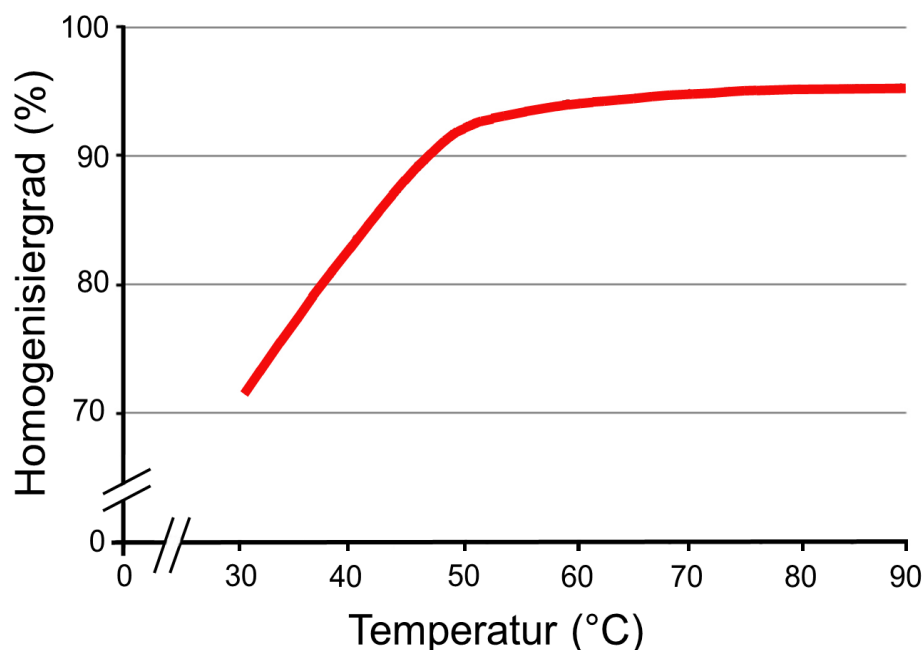
Das Milchfett in der Rohmilch liegt als durch Lipoproteinmembranen geschützte Fettkügelchen in einem emulgierten Zustand vor.

Aufgrund der Größe der Fettkügelchen von 0,1 – 10 µm (ca. 90 % des Milchfettes liegt in Kügelchen mit einem Durchmesser von 1 - 8 µm vor), der geringen Dichte des Fetts (<1 g/ml) steigt das Fett in unbehandelter Rohmilch an die Milchoberfläche auf, dies wird als Aufrahmen bezeichnet (GOUDÉDRANCHE et al. 2000; TÖPEL 2004; FRISTER 2007).

Um dieses unerwünschte Entmischen weitgehend zu unterbinden, wird beim Homogenisieren der Durchmesser der in der Milch enthaltenen Fettkügelchen soweit verkleinert, dass sich die Auftriebs- und Schwerkraft, die auf die Kügelchen wirkt, fast aufhebt (STRAHM u. EBERHARD 2010), was ein späteres Aufrahmen der Konsummilch für den Zeitraum der Mindesthaltbarkeit verhindert.

Da die Größe der Fettkügelchen mit der Geschwindigkeit des Aufrahmens korreliert, unterscheidet sich die erforderliche Endgröße der Kügelchen bei verschiedenen Produktarten. Reicht es bei traditionell hergestellter pasteurisierter Milch und ESL-Milch, die Fettkügelchen auf  $0,5 - 1,0 \mu\text{m}$  (STRAHM u. EBERHARD 2010) oder maximal  $1,5 \mu\text{m}$  (SPREER 2005) zu verkleinern um das Aufrahmen für einige Tage aufzuhalten, so muss der Durchmesser bei mehrere Monate haltbarer UHT-Milch auf  $0,3 - 0,8 \mu\text{m}$  (FRISTER 2007) oder sogar auf  $0,2 - 0,7 \mu\text{m}$  (SPREER 2005) verringert werden, um ein Entmischen über die gesamte Haltbarkeitsdauer zu verhindern.

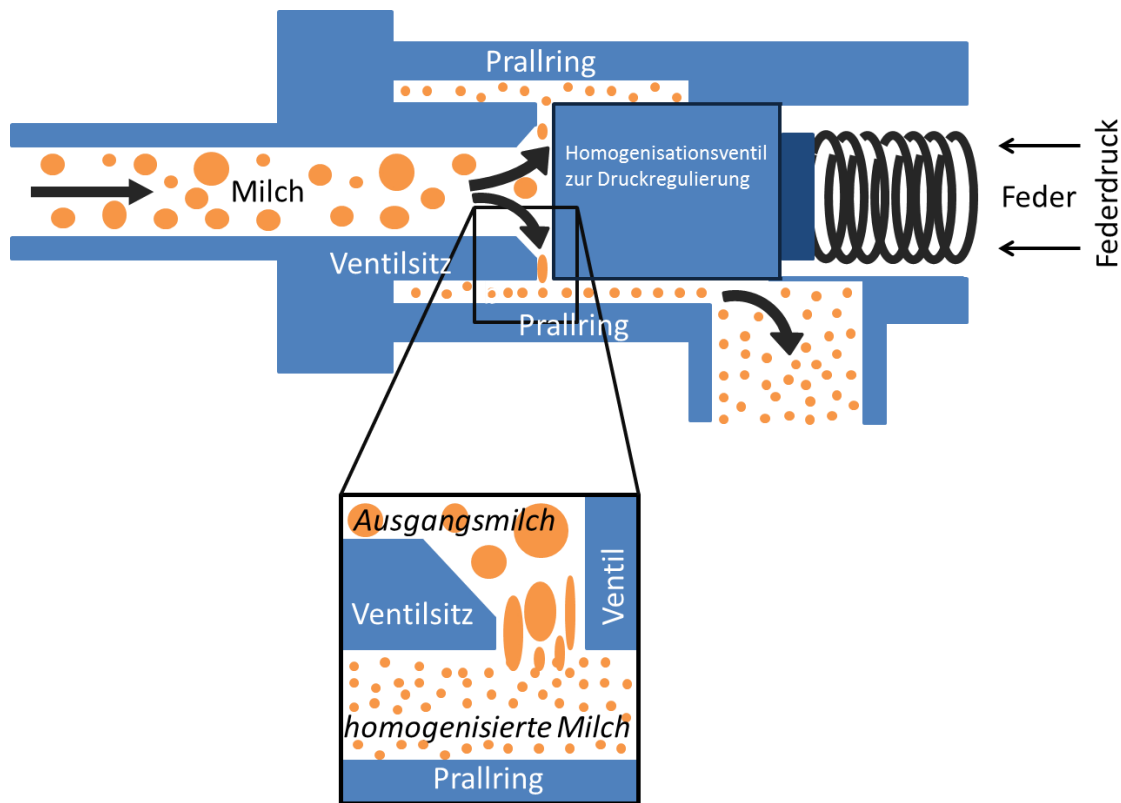
Das Homogenisieren von Milch wird mit einem Druck zwischen 140 bar für Frischmilch und 250 bar für UHT-Milch (JAHNKE 2008) bei Temperaturen zwischen 40 und 80 °C durchgeführt (Abbildung 2-2), da mit steigender Temperatur das MilCHFett in seine flüssige Phase übergeht und Kavitationseffekte ab ca. 30 °C verstärkt zur Wirkung kommen.



**Abbildung 2-2** Einfluss der Temperatur auf den Homogenisierungsgrad bei einem Homogenisierungsdruck von 200 bar (modifiziert nach RENNER 1987)

Dabei wird der Homogenisierungseffekt dadurch erreicht, dass die Milch unter hohem Druck durch ein Ventil gedrückt wird, dessen Öffnung wenig größer als

die Fettkügelchen ist. Diese werden durch eine Kombination von Scherkräften, Turbulenzen und Kavitation zerrissen (Abbildung 2-3). Aus den Fragmenten formen sich daraufhin sofort wieder neue, kleinere Fettkügelchen (RENNER 1987; JAHNKE 2008).



**Abbildung 2-3** Schema eines Homogenisierventils (modifiziert nach JAHNKE 2008; STRAHM u. EBERHARD 2010)

Durch das Verkleinern der Fettkügelchendurchmesser wird gleichzeitig ihre Anzahl um etwa den Faktor 1000 und die Oberfläche um das 8- bis 10-fache (SPREER 2005) vergrößert, da die Oberfläche  $O$  dem Durchmesser  $d$  umgekehrt proportional ist. Die Gesamtoberfläche der Fettkügelchen von un behandelter Vollmilch mit einem Fettgehalt von 3,8 % liegt bei ca. 70 m<sup>2</sup>/l (BELITZ et al. 2001).

$$\frac{O_1}{O_2} = \frac{d_2}{d_1}$$

Neben dem Verhindern des Aufrahmens hat das Homogenisieren noch weitere Vorteile wie eine weiße Optik, einen vollmundigeren Geschmack und eine bessere Verdaulichkeit (SPREER 2005; FRISTER 2007).

Die stark vergrößerte Oberfläche führt andererseits auch zu einer größeren Angriffsfläche für mikrobielle Lipasen und zu einem höheren Bedarf an Hüllenmaterial, welcher durch Einbau von Caseinen und Molkenproteinen kompensiert wird. Dies wiederum führt zu veränderten technofunktionellen Eigenschaften der Fettkügelchen, wie einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Lichteinflüssen und einer geringeren thermischen Stabilität der Milcheiweiße (SPREER 2005; FRISTER 2007). Daher findet bei direkten Hoch- oder Ultrahoherhitzungsprozessen die Homogenisierung nach der Erhitzung statt (STRAHM u. EBERHARD 2010).

Auf die Proteinfraction haben Belastungen, wie sie in der Homogenisierung verwendet werden, keine Einflüsse. Eine Denaturierung von Eiweißen tritt erst ab einem Druck von mehr als 1000 bar auf (HUPPERTZ et al. 2006).

Homogenisierte Trinkmilch musste in Deutschland mit dem Hinweis „homogenisiert“ gekennzeichnet sein (Verordnung zur Durchführung des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007). Diese Vorschrift ist mittlerweile zwar weggefallen, meistens wird es jedoch noch immer angegeben.

### **2.2.6 Pasteurisation und Ultrahoherhitzung**

Der Zweck der Pasteurisation der Rohmilch ist die thermische Inaktivierung pathogener Mikroorganismen. Hierdurch wird die Milch einige Tage lagerfähig (RENNER 1987) und potentiell enthaltene Krankheitserreger, die die Gesundheit des Menschen gefährden könnten, werden abgetötet (BELITZ et al. 2001; STRAHM u. EBERHARD 2010).

Nach Verordnung (EG) NR. 853/2004 sowie BGBl. 2007 Teil I Nr. 39 ist die Pasteurisation eine Kurzzeit- oder Dauererhitzung bei Temperaturen von mindestens

a) 72 °C für 15 Sekunden (High Temperature Short Time - HTST) oder

b) 63 °C für 30 Minuten (Dauerpasteurisierung, Low Temperature Long Time – LTLT oder LTH – Low Temperature Holding) (CLAEYS et al. 2002) oder jeder anderen Temperatur/Zeit-Kombination mit gleicher Wirkung.

Im Vergleich hierzu wird sogenannte UHT-Milch (Ultrahocherhitzte Milch, H-Milch) bei einer Temperatur von mindestens 135 °C einige Sekunden erhitzt, was zu praktischer Keimfreiheit führt. In Verbindung mit aseptischer Abfülltechnik ist diese Art der Herstellung geeignet, Konsummilch ungekühlt mehrere Monate (bis 6 Monate) haltbar zu machen.

Zwischen den Pasteurisationsverfahren, wie sie bei traditionell hergestellter pasteurisierter Milch angewendet werden, und der Ultrahocherhitzung liegt die Hoherhitzung. Diese findet bei Temperaturen zwischen 85 °C und 127 °C bei Heißhaltezeiten im Sekundenbereich statt und ist eines der Verfahren, die in der Herstellung von sogenannter ESL-Milch Anwendung finden.

### **2.3 Pasteurisierte Milch – traditionell hergestellt**

In der Praxis wird in Deutschland die Werkmilch bei Temperaturen von 71,7 °C (161 °F) - 75 °C und einer Heißhaltezeit von 15 – 30 Sekunden pasteurisiert (ZALL 1981; SPREER 2005; FRISTER 2007; LYNCH et al. 2007; KAUFMANN et al. 2009; LORENZEN et al. 2011). Dabei wird der größte Teil der in der Rohmilch vorhandenen Mikroorganismen abgetötet (GRANT et al. 1998; LUND et al. 2000; SABOYA u. MAUBOIS 2000). Die Verminderung der Gesamtkeimzahl beträgt hierbei in Abhängigkeit von der Ausgangskeimflora 98 – 99,9% (RENNER 1987).

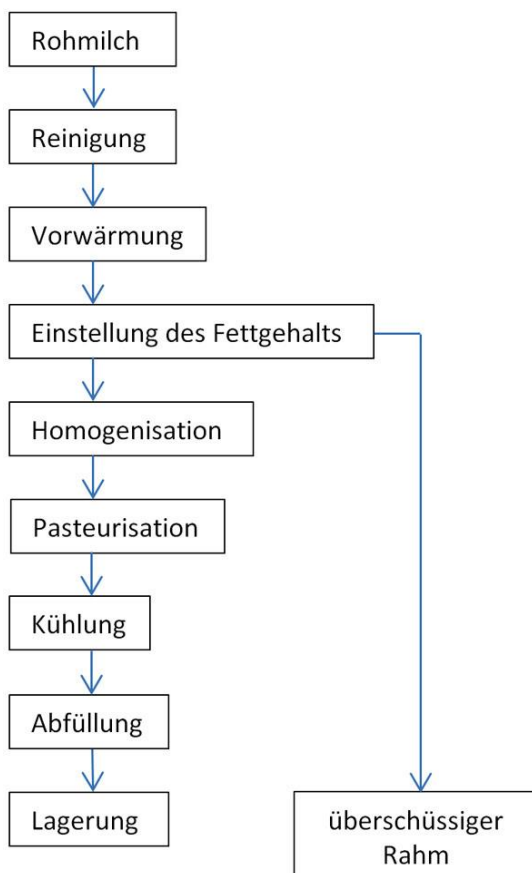
Als Erhitzungsindikatoren für die ordnungsgemäße Pasteurisation werden die milcheigenen Enzyme alkalische Phosphatase (AP) und Lactoperoxidase (LP) (MORTIER et al. 2000; CLAEYS et al. 2002; EBERHARD u. REHBERGER 2005; HOFFMANN et al. 2006; RYSSTAD und KOLSTAD 2006; MAYER et al. 2009; LORENZEN et al. 2011) herangezogen.

Nach der klassischen Pasteurisation muss die AP inaktiviert und die Lactoperoxidase weiterhin aktiv sein (SCHÖNE 2003; RYSSTAD und KOLSTAD 2006; FRISTER 2007).

Der negative Phosphatase-Nachweis dient hierbei als indirekter Beweis für das Abtöten pathogener Mikroorganismen (SPREER 2005) wie *Mykobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Salmonella* spp. und *Campylobacter jejuni* (ROSENTHAL 1991).

Pasteurisierte Milch gilt als sicher im Hinblick auf die Gesundheit des Verbrauchers und trotz der Inaktivierung der AP unterliegt sie nur einem Minimum an chemischen, physikalischen und organoleptischen Veränderungen (MARTIN et al. 1997; CLAEYS et al. 2002). Sie muss nach der Produktion gekühlt aufbewahrt werden, um bakterielles Wachstum und Verderb zu verlangsamen (DEGEN et al. 1992).

Eine auf diese Weise behandelte Frischmilch hat bei Kühl Lagerung bis 8 °C eine Haltbarkeit von 5 bis 8 (BERGER 2002; SPREER 2005; HÜLSEN, 2006; FRISTER 2007) bzw. 10 (KAUFMANN et al. 2009) bis 12 Tagen (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a).



**Abbildung 2-4** Schema des Produktionsablaufes zur Herstellung traditioneller pasteurisierter Frischmilch

## **2.4 Pasteurisierte Milch - ESL-Milch**

### **2.4.1 Herstellung und Eigenschaften von ESL-Milch**

Der Begriff ESL-Milch und die zur Herstellung verwendeten Verfahren sind in der Europäischen Union nicht gesetzlich definiert (BERGER 2002; SPREER 2005; MAYER et al. 2009). Lediglich die Kennzeichnung „länger haltbar“ sowie der Vermerk „hocherhitzt“ oder „mikrofiltriert“ (BRANDL 2009) und eine längere Mindesthaltbarkeit weisen ESL-Milch als im Unterschied zur traditionell hergestellten Frischmilch besonders behandelt aus.

Es handelt sich also um ein Produkt, welches durch verschiedene Verfahren zur Keimreduktion, die über die normale Pasteurisation hinausgehen, so behandelt wurde, dass es gekühlt eine längere Haltbarkeit als herkömmliche pasteurisierte Frischmilch, aber im Vergleich keine oder nahezu keine Qualitätseinbußen aufweist (RYSSTAD u. KOLSTAD 2006). Die Lagerfähigkeit kann durch diese Verfahren bereits jetzt um das Dreifache verlängert werden (BRUCH u. PELLEGRINO 2006).

Während traditionell hergestellte pasteurisierte Frischmilch (TH-HTST) in Deutschland unter optimalen Lagerbedingungen eine Haltbarkeit von sechs bis höchstens zwölf Tagen aufweist, wurde bei ESL-Milch in Europa schon 2003 eine Mindesthaltbarkeit von mindestens 21 Tagen bei einer Lagertemperatur von 8 °C angestrebt (SCHÖNE 2003; RYSSTAD u. KOLSTAD 2006). In Abhängigkeit der Herstellungsvarianten wird mittlerweile von einer Haltbarkeit von 18 – 30 Tagen bei einer Lagertemperatur von 8 °C ausgegangen (KAUFMANN et al. 2010).

Die durch verschiedene Verfahren hergestellten Produkte unterscheiden sich neben der Mindesthaltbarkeit auch hinsichtlich des Geschmacks und einer unterschiedlichen Mikroflora voneinander. So sind zum Beispiel in hocherhitzter ESL-Milch (ESL-HE-Milch) sowohl direkt nach der Herstellung als auch nach 30 Tagen Kühlagerung bei 10 °C nur vereinzelt Sporen oder Sporenbildner vorhanden, während sofort nach der Produktion von mikrofiltrierter und pasteurisierter Milch auch vegetative Keime nachgewiesen werden können (KAUFMANN u. KULOZIK 2008).



Als Kriterium für die Haltbarkeit von ESL-Milch dient bisher ausschließlich der mikrobielle Verderb, wobei man bezüglich der mesophilen Gesamtkeimzahl von einer „Verderbnisgrenze“ bei  $10^6$  KBE/ml (MAYR et al. 2004; HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a; SCHODER et al. 2007) ausgeht, da ab dieser Anzahl erste haptisch wahrnehmbare Stoffumsetzungen durch Bakterien stattfinden (LUND et al. 2000; FRISTER 2007). Andere Faktoren wie lipolytische, proteolytische oder chemisch-physikalische und sensorische Veränderungen im Produkt finden dabei kaum Berücksichtigung (KAUFMANN u. KULOZIK 2008). Neben dem mikrobiellen Wachstum wirken sich auch die originär in der Rohmilch enthaltenen oder mikrobiell freigesetzten Enzyme auf die Qualität der ESL-Milch und damit auf ihre Haltbarkeit aus. Durch enzymatische (hydrolytische) Umsetzungen kann es noch während der Lagerung im Kühlregal zu ranzigem oder käsigem Fehlgeschmack kommen (KAUFMANN u. KULOZIK 2008). Dies verdeutlicht, dass schon die Rohmilchqualität entscheidenden Einfluss auf die Lagerstabilität des Endproduktes hat.

Während die milcheigene Lipoprotein-Lipase bereits in ordnungsgemäß pasteurisierter Milch vollständig zerstört ist (TÖPEL 2004; KULOZIK et al. 2009), können in der Rohmilch enthaltene mikrobielle Enzyme weder durch Kurzzeiterhitzung (HTST) noch durch Hoherhitzung vollständig inaktiviert werden. Diese Lipasen bewirken die gleichen sensorischen Abweichungen wie die originäre Milchlipase. Vor allem die Enzyme der Pseudomonaden sind durch eine niedrige Aktivierungsenergie schon bei 4 – 7 °C aktiv und können während der Lagerung im Kühlregal oder beim Verbraucher zu ranzigem oder seifigem Fehlgeschmack führen (TÖPEL 2004). Daher spielt nicht nur die Gesamtkeimzahl der Rohmilch eine Rolle, sondern es kommt überdies auf die Zusammensetzung der Keimflora an. Liegen enzymbildende Spezies wie *Pseudomonas*, *Bacillus* oder *Paenibacillus* in der Rohmilch vor, können diese durch Sekretion von Enzymen schon vor der Verarbeitung der Milch deren Qualität mindern (KULOZIK et al. 2009).

Höhere Enzymkonzentrationen in der Rohmilch haben somit höhere Substratumsetzungen im Endprodukt und dadurch eine geringere Lagerstabilität infolge sensorischer Beeinträchtigungen zur Folge, wenngleich

bei ESL-HE-Milch nur eine niedrige Restenzymaktivität vorliegt und damit nur in geringem Maße lagerungsbedingte Lipolyse stattfindet (KULOZIK et al. 2009).

Generell können durch Hitzebehandlung Proteine, Aminosäuren und Vitamine geschädigt werden, was zu einem Nährstoffverlust führt (Tabelle 2-1). So führt die traditionelle Pasteurisierung zu einer Verlustrate der hitzelabilen Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C und Folsäure von unter 10 % während bei einer UHT-Behandlung die Verluste bis zu 20 % betragen (SIEBER 1989). Andere Autoren gehen von einer Schädigung bis 30 % aus (BELITZ et al. 2001).

	*	Einheit	Vollmilch TH-HTST	Vollmilch UHT
Protein	*1	g	3,3	3,3
Fett	*1	g	4	4,1
Laktose	*1	g	4,7	4,6
Cholesterin	*1	mg	14,9	15,5
Energie	*1	kcal	67	68
Natrium	*1	mg	39	39
Kalzium	*1	mg	122	120
Kalium	*1	mg	155	156
Magnesium	*1	mg	10,4	10,1
Phosphor	*1	mg	92	91
Zink	*1	mg	0,362	0,365
Eisen	*1	µg	14,5	13,5
Kupfer	*1	µg	2,4	2,3
Mangan	*1	µg	2,1	2,1
Selen	*2	µg	0,86	0,9
Vitamin A	*1	µg	46	44
Vitamin E	*2	µg	112	131
Vitamin B <sub>1</sub>	*2	µg	20	20
Vitamin B <sub>2</sub>	*2	µg	147	157
Vitamin B <sub>6</sub>	*2	µg	18	29
Vitamin B <sub>12</sub>	*2	µg	0,12	0,12
Biotin	*2	µg	2,2	2,1
Folsäure	*2	µg	5,1	4,3
Niacin	*2	µg	100	115
Pantothensäure	*2	µg	440	475
Vitamin C	*2	µg	1057	1010

**Tabelle 2-1**

Zusammensetzung und Gehaltswerte von traditionell hergestellter pasteurisierter und ultrahocherhitzter Milch im Vergleich

\*1) Mittelwert; \*2) Median  
(modifiziert nach STRAHM und EBERHARD 2010)

Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass die im Vergleich zu traditionell hergestellter pasteurisierter Milch höhere Erhitzung der ESL-HE-Milch zu etwas stärkerer Schädigung der Inhaltsstoffe führt, aber zu einer geringeren Beeinträchtigung als bei der UHT-Behandlung. Die Verluste an Vitamin B<sub>1</sub> und Vitamin C sind hierbei am größten (WALTHER 2009; COORS 2010), die Verluste von Thiamin befinden sich dagegen bei weniger als 3 % (KAUFMANN et al. 2009).

Bei direkt erhitzter Milch waren die Verluste über eine Lagerdauer von 4 Wochen etwas höher als bei indirekt erhitzter HE-Milch (EBERHARD et al. 2003) (Tabelle 2-2). Da der Beitrag der Milch zur Versorgung des Menschen mit diesen Vitaminen aber gering ist und schon bei UHT-Milch die Schädigungen als gering beurteilt werden (KESSLER u. FINK 1986; SIEBER 1989; KAUFMANN et al. 2009), können diese Verluste hier vernachlässigt werden. Lorenzen (2009) konnte in einer von ihm durchgeführten Untersuchung keinen Hinweis auf niedrigere Vitaminkonzentrationen in ESL-HE-Milch als in HTST-behandelter Milch feststellen.

**Tabelle 2-2** Vitaminverluste in direkt und indirekt hocherhitzter ESL-Milch nach 4 Wochen Lagerung bei 5 °C (GALLMANN et al. 2004)

Vitamin	Gehalt frisch [µg/L]	Verlust direkt erhitzt [ % ]	Verlust indirekt erhitzt [ % ]
B <sub>1</sub>	182	15	5
B <sub>6</sub>	386	7	kein Verlust
B <sub>12</sub>	1,30	kein Verlust	kein Verlust
Folsäure	30	kein Verlust	kein Verlust

In Abhängigkeit von der Lagerdauer und -temperatur sowie dem Vorhandensein von Sauerstoff führt die Lagerung erhitzter Milch jedoch immer zu mehr oder weniger großen Vitaminverlusten (SIEBER 1989; DOLFINI et al. 1991; SIERRA u. VIDAL-VALVERDE 2000; SIERRA et al. 2000).

Da ESL-Milch kühl gelagert werden muss, bleiben die lagerungsbedingten Vitaminverluste unbedeutend (WALTHER 2009). Die Lagerstabilität von Vitaminen in ESL-Milch ist vergleichbar mit der von HTST-erhitzter Milch (LORENZEN et al. 2011).

Weitere Veränderungen in ESL-HE-Milch gegenüber herkömmlicher pasteurisierter Milch bestehen in Form von hitzeinduzierter Bildung von Laktulose aus Laktose (CATTANEO et al. 2008) und der Denaturierung von Molkenproteinen. Hier wird vornehmlich das Haupt-Molkenprotein Beta-Laktoglobulin ( $\beta$ -LG) zur Bestimmung der Hitzebelastung einer Trinkmilch herangezogen (CLAEYS et al. 2004), da dieses schneller denaturiert als beispielsweise das Alpha-Laktalbumin (ANEMA 2008).

Während Laktulose in Rohmilch nicht nachweisbar ist und ein reines Nebenprodukt einer Hitzebehandlung darstellt (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a; FRAHM u. GRUCHOT 2010), ist das Molkenprotein  $\beta$ -LG ein originärer Rohmilchbestandteil. Der quantitative Nachweis der gebildeten Laktulose und der Denaturierung von  $\beta$ -LG stehen in direktem Zusammenhang zur Hitzebehandlung (MORALES et al. 2000).

Eine Denaturierung von  $\beta$ -LG kann schon bei der Thermisierung nachgewiesen werden. Dagegen bildet sich Laktulose erst ab Hitzebelastungen bei oder oberhalb der Pasteurisation (Tabellen 2-3 und 2-4).

**Tabelle 2-3** Durchschnittswerte mit Standardabweichungen (n = 15 für jede Gruppe) für die Bildung von Laktulose und das Denaturieren von  $\beta$ -LG bei verschiedenen Herstellungsprozessen. (nach MORALES et al. 2000)

Industrial process	Preheating °C / s	Heating °C / s	Lactulose mg / L	$\beta$ -LG mg / L
Raw			< 50	4310 $\pm$ 135
Thermization		65 / 10	< 50	3800 $\pm$ 60
Pasteurization		85 / 30	< 50	1706 $\pm$ 225
Direct UHT	80 / 24	150 / 4	120 $\pm$ 10	389 $\pm$ 34
Indirect UHT	90 / 20	140 / 3	250 $\pm$ 15	322 $\pm$ 16
Indirect UHT	90 / 20	140 / 10	456 $\pm$ 24	63.4 $\pm$ 1.5
Sterilization in-bottle	138 / 15	116 / 1000	1121 $\pm$ 56	< 10

**Tabelle 2-4** Einfluss verschiedener Erhitzungsverfahren auf den  $\beta$ -LG und Laktulose-Wert in Trinkmilch (modifiziert nach STRAHM und EBERHARD 2010)

Bezeichnung	Technologie	Temperatur und Heisshaltezeit	$\beta$ -LG-Wert [mg/l]	Lactulose-Wert [mg/Kg]
roh	unbehandelt	-	~ 3600	< 10
thermisiert	Plattenwärmetauscher	ca. 65 °C ca. 20 Sekunden	~ 3400	< 10
traditionell pasteurisiert	Plattenwärmetauscher	ca. 74 °C ca. 20 Sekunden	~ 3100	~ 10
hochpasteurisiert (ESL-HE)	direkte Erhitzung mit Injektion	ca. 127 °C ca. 3 Sekunden	> 1600	~ 25
hochpasteurisiert (ESL-HE)	direkte Erhitzung mit Infusion	ca. 127 °C ca. 3 Sekunden	> 1700	~ 20
hochpasteurisiert (ESL-HE)	indirekte Erhitzung mit Wärmetauscher	ca. 125 °C ca. 2 Sekunden	~ 1000	~ 30
mikrofiltriert und pasteurisiert (ESL-MF)	Magermilch mikrofiltriert, Rahm hochpasteurisiert, Gemisch pasteurisiert	Rahm: ca. 125 °C, ca. 2 s Gemisch: ca. 74 °C, ca. 20 s	~ 2500	~ 17
tiefenfiltriert und pasteurisiert (ESL-MF)	Magermilch tiefenfiltriert, Rahm hochpasteurisiert, Gemisch pasteurisiert	Rahm: ca. 125 °C, ca. 2 s Gemisch: ca. 74 °C, ca. 20 s	< 2500	~ 15
bactofugiert und pasteurisiert (ESL)	Rohmilch - Vorentkeimung mittels 2 Entkeimungs- separatoren, pasteurisiert	ca. 74 °C ca. 20 Sekunden	~ 3000	~ 10
UHT	direkte Erhitzung mit Injektion oder Infusion	ca. 150 °C ca. 2 Sekunden	~ 800	~ 100
UHT	indirekte Erhitzung mit Wärmetauscher	ca. 138 °C ca. 3 Sekunden	~ 200	~ 300

Aus den Veränderungen dieser Milchbestandteile (Time Temperature Integrator – TTI) kann also sehr genau auf die tatsächliche Hitzebelastung eines Milchproduktes geschlossen werden (CLAEYS et al. 2002). Solche Indikatorsubstanzen können zur analytischen Produktcharakterisierung herangezogen werden (Tabelle 2-5), haben jedoch auf die

verbraucherrelevanten Eigenschaften oder die ernährungsphysiologische Wertigkeit keinen Einfluss (KAUFMANN et al. 2010).

**Tabelle 2-5** Vergleich von thermisch-induzierten Veränderungen in TH-HTST- und ESL-Milch (modifiziert nach KAUFMANN et al. 2010)

	TH-HTST	ESL-MF	ESL-HE direkt [127 °C/2s]	ESL-HE indirekt [127 °C/2s]
Keimreduktion [ $\log N/N_0$ ]	1,5	5 - 6	> 8	
Phosphatase	-	-	-	-
Peroxidase	+	+	-	-
Natives $\beta$ -Laktoglobulin [g/l]	3,1 - 3,4	3,0 - 3,3	> 2,2	< 1,8
Laktulose [mg/l]	15 - 20	15 - 20	< 25	< 30
Kochgeschmack	-	-	gering bis -	gering bis -
(Rest-)Enzymaktivität Protease [%]	> 80	81 $\pm$ 4	65 $\pm$ 5	65 $\pm$ 5
(Rest-)Enzymaktivität Lipase [%]	> 65	64 $\pm$ 4	40 $\pm$ 3	40 $\pm$ 3
Haltbarkeit (bei 10 °C) [Tage]	7 - 10	18-21	24-30	24-30

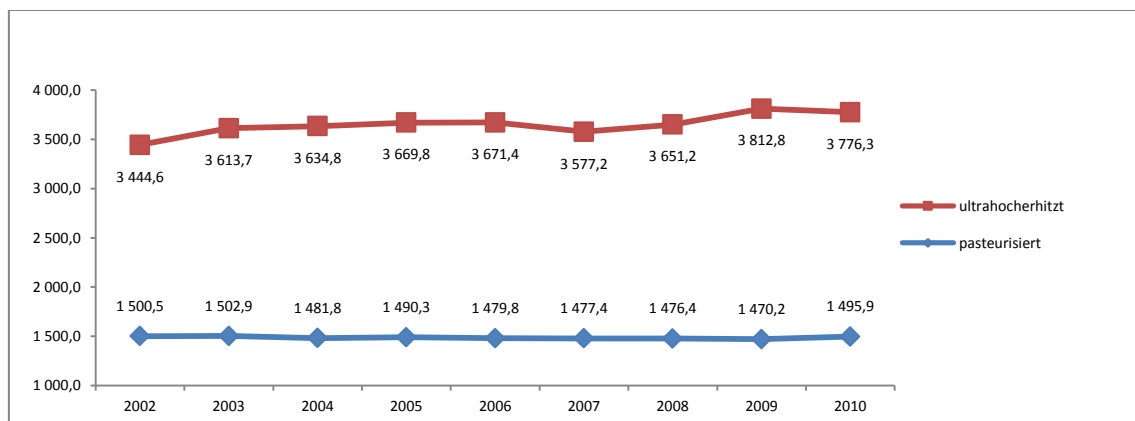
Neben der Rohmilchqualität und der Verarbeitung hat schließlich auch die Art der Abfüllung und der Lagerung einen Einfluss auf die Haltbarkeit von ESL-Milch (STRAHM u. EBERHARD 2010). Während für Frischprodukte mit Kühlagerung Abfüllprozesse in Räumen unter normalen Umgebungsbedingungen ausreichen, ist für Produkte mit langer Haltbarkeitsdauer wie ESL- und UHT-Milch im Gegensatz zu traditionell hergestellter pasteurisierter Milch eine aseptische Abfüllung, also das Abfüllen keimfreier Produkte in sterile Verpackungen unter keimfreien Bedingungen erforderlich (SPREER 2005).

#### 2.4.2 Wirtschaftliche Bedeutung von ESL-Milch in Deutschland

Bereits 1996 wurde in Deutschland ESL-Milch angeboten, der Marktanteil betrug damals rund 2 % (Landesvereinigung der Milchwirtschaft NRW 2009). Noch im Jahr 2005 waren 4,2 % (WOCKEN u. SPILLER 2007), 2006 dagegen schon ca. 20 % der Frischmilch, die in Deutschland vermarktet wurde, ESL-Produkte (RYSSTAD u. KOLSTAD 2006; BRANDL 2009).

Mittlerweile beläuft sich der Anteil von länger haltbaren Produkten auf über 75% der pasteurisierten Frischmilch (Landesvereinigung der Milchwirtschaft NRW 2009).

Wie in Abbildung 2-5 zu sehen, hat sich der Anteil und die Gesamtmenge der pasteurisierten Frischmilchprodukte zwischen 2002 und 2010 in Deutschland kaum verändert. ESL-Produkte ersetzen also mittlerweile den größten Teil der traditionell hergestellten Frischmilch in den Regalen des Einzelhandels.



**Abbildung 2-5** Konsummilchproduktion in Deutschland 2002 – 2010 in 1000 t  
(Daten: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung)

## 2.4.3 Herstellungsverfahren von ESL-Milch in Deutschland

### 2.4.3.1 Hoherhitzung

Die Hoherhitzung fällt nach Verordnung (EG) NR. 853/2004 noch in den Bereich der Pasteurisierung und wird daher bei Temperaturen von mehr als 80 °C auch als Hoch-Pasteurisation bezeichnet (LAN et al. 2010).

Diese Form der Wärmebehandlung kommt neben der Mikrofiltration bei der Herstellung von ESL-Milchprodukten zur Anwendung.

Hoherhitzung bezeichnet Wärmebehandlungsverfahren bei denen die Milch bei Temperaturen zwischen 85 °C und 127 °C und Zeiten im Sekundenbereich erhitzt wird (FRISTER 2007). Die Erhitzungstemperaturen sind hier also nicht genau festgelegt (SPREER 2005).

Durchgeführt werden kann die Hoherhitzung in bereits bestehenden UHT-Anlagen (STRAHM u. EBERHARD 2010).

Das Enzym Lactoperoxidase ist eines der stabilsten originären Enzyme der Kuhmilch (LORENZEN et al. 2011) und wird ab Temperaturen von ca. 80 °C inaktiviert (STRAHM u. EBERHARD 2010). Daher müssen nach einer solchen Behandlung die Enzyme Phosphatase und Lactoperoxidase inaktiviert sein (MORTIER et al. 2000; SCHÖNE 2003; FRISTER 2007).

Für die Produktion von ESL-HE-Milch werden Temperatur/Zeit-Kombinationen von 120 °C (BRUCH u. PELLEGRINO 2006) bis 127 °C für 2 – 4 (FRISTER 2007; KULOZIK et al. 2009; MAYER et al. 2009) bzw. 5 Sekunden (RYSSTAD u. KOLSTAD 2006; MAYER et al. 2009; LORENZEN et al. 2011), bei direkter oder indirekter Erhitzung oder optional eine Erhitzung auf 130 °C (KAUFMANN u. KULOZIK 2006) bis 135 °C für 0,5 Sekunden (KAUFMANN et al. 2009; KULOZIK et al. 2009) verwendet. Wobei die Milch nach letzterer Methode, wie sie vorwiegend in Japan und Nordamerika durchgeführt wird, geschmacklich eher der UHT-Milch als pasteurisierter Frischmilch ähnelt (GALLMANN et al. 2001). Mittels HE-Behandlung können durch Reduktion sämtlicher im Rohprodukt enthaltener Keime um etwa 8 Zehnerpotenzen (KAUFMANN et al. 2009) praktisch sämtliche in der Rohmilch enthaltenen vegetativen Keime inaktiviert werden. Dennoch ist ESL-Milch kein steriles Produkt und muss kühl gelagert werden (STRAHM u. EBERHARD 2010).

Sporen können diese Prozedur überleben (WITTHUHN et al. 2011), keimen jedoch unter Kühllagerbedingungen normalerweise nicht aus und sind somit nicht stoffwechselaktiv (KULOZIK et al. 2009).

Die Haltbarkeit von hoherhitzter Milch wird bei beiden Verfahren im deutschsprachigen Raum mit 24 bzw. 25 – 30 Tagen bei 8 °C Lagertemperatur angegeben (HÜLSEN 2006; KAUFMANN et al. 2009). Andere Autoren gehen davon aus, dass bei entsprechend keimarmer Abfüllung sogar bis zu 45 Tage bei 10 °C erreicht werden können (RYSSTAD u. KOLSTAD 2006).

Zur Hoherhitzung von ESL-Milch werden 2 verschiedene Verfahren verwendet.

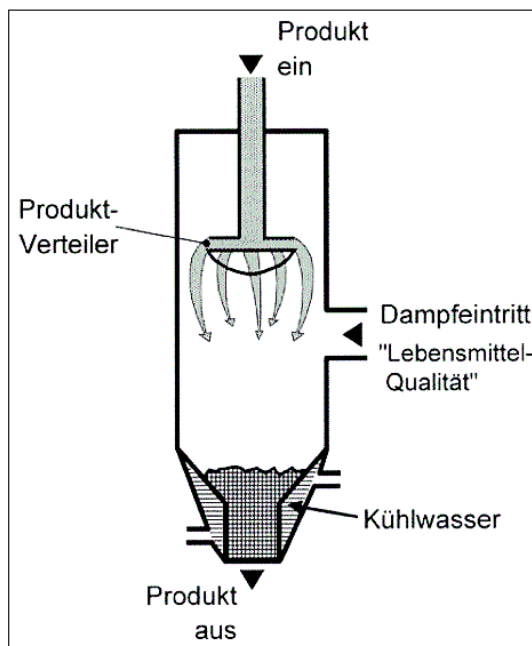


Zum einen die direkte Hoherhitzung mit Dampf-injektion oder Dampfinfusion und zum anderen die indirekte Erhitzung mittels Platten- oder Röhrenwärmetauschern.

### Direkte Hoherhitzung

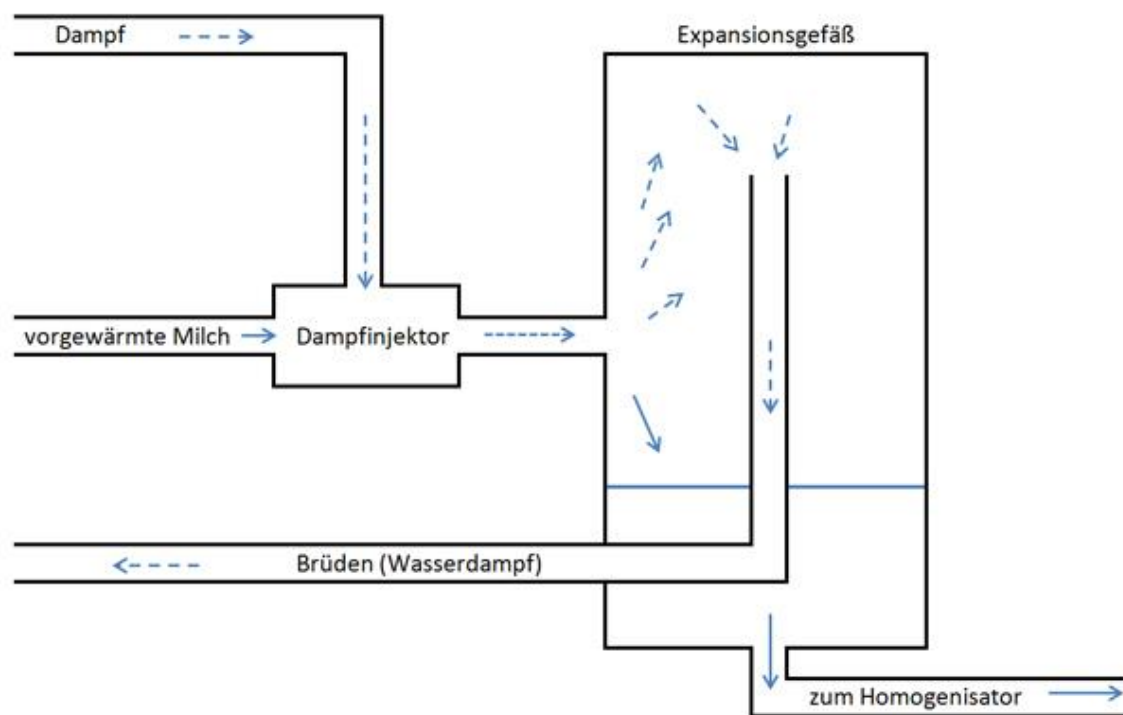
Vor der eigentlichen Hoherhitzung wird die gereinigte Milch auf Temperaturen zwischen 70 und 85 °C vorgewärmt (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a). Dies geschieht sowohl bei der direkten, als auch bei der indirekten Variante durch Platten- oder Röhrenwärmetauscher im regenerativen Wärmeaustausch zwischen zu erhitzender und abzukühlender Milch bzw. Wasser (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008b; STRAHM u. EBERHARD 2010).

Bei der anschließenden direkten Hoherhitzung wird entweder mit der Dampf-in-Milch-Injektion gearbeitet, bei der Wasserdampf direkt in die zu erhitzende Milch einströmt oder mit der Milch-in-Dampf-Infusion, bei der die Milch durch einen Verteiler in vielen dünnen Strahlen in einem dampfgefüllten Druckbehälter versprüht wird (Abbildung 2-6) (SPREER 2005; STRAHM u. EBERHARD 2010).



**Abbildung 2-6** Schema eines Dampfinfusers (STRAHM und EBERHARD 2010)

Ein Vorteil dieser Verfahren ist die sehr schnelle Erhitzung der Milch, die so in Sekundenbruchteilen auf rund 127 °C gebracht werden kann (STRAHM u. EBERHARD 2009), was im Vergleich zu einer indirekten Erhitzung zu einer kürzeren Hitzebelastung und damit zu geringerer Denaturierung der Inhaltsstoffe führt (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a). Auf dieser Temperatur wird die Milch für ca. 3 Sekunden gehalten (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a). Die in Form von Dampf zugeführte Wassermenge wird anschließend unter Vakuum in einem Expansionsgefäß (auch Flash-Kühler genannt) wieder entfernt (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a; STRAHM u. EBERHARD 2010) (Abbildung 2-7).



**Abbildung 2-7** Schema einer Dampf-injektion mit anschließender Expansion (modifiziert nach STRAHM u. EBERHARD 2010)

Diese Methode ist für die Milch schonender und mit geringfügig weniger chemischen und sensorischen Veränderungen verbunden als die indirekte HE (EBERHARD u. REHBERGER 2005). Nachteile der direkten HE sind die stark eingeschränkte Möglichkeit zur Wärmerückgewinnung (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a) sowie die Tatsache, dass der Homogenisator im Produktionsverlauf hinter der Hoherhitzung geschaltet (*downstream*) ist

(Abbildung 2-9) und somit aseptisch arbeiten muss um eine Rekontamination des bereits hochpasteurisierten Produktes zu vermeiden (SPREER 2005; SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a). Dies bedeutet höhere Investitionskosten bei der Erstellung der Anlage (Tabelle 2-6). Die Unterschiede der Erhitzungsprofile sind am Beispiel der Profile der direkten und indirekten Ultrahocherhitzung im Vergleich zur klassischen Pasteurisierungsbehandlung in Abbildung 2-20 verdeutlicht.

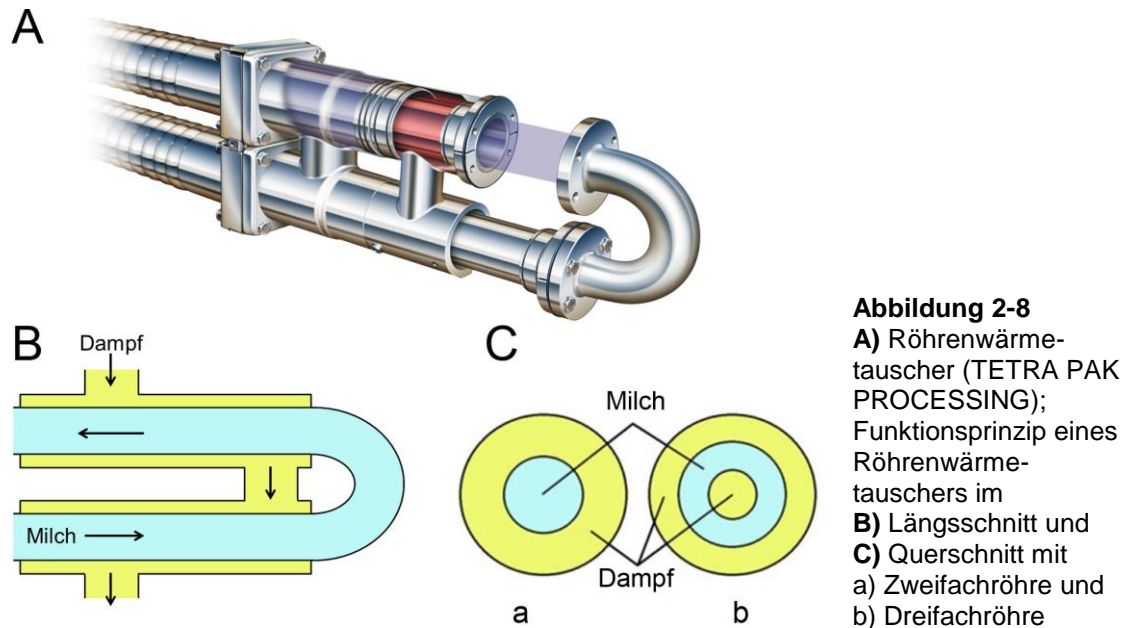
**Tabelle 2-6** Vor- und Nachteile des direkten und indirekten Erhitzungsverfahrens (modifiziert nach STRAHM und EBERHARD 2010)

Direkte Erhitzung	Indirekte Erhitzung
+ wenig Proteindenaturierung	+ günstigere Anlage
+ Geschmack der Milch	+ gute Wärmerückgewinnung möglich
- weniger Wärmerückgewinnung möglich	- Molkenproteindenaturierung hoch
- teurere Anlage	- Kochgeschmack
- aseptischer Homogenisator erforderlich	

### Indirekte Hoherhitzung

Hierbei wird die Milch ausschließlich in Platten- oder Röhrenwärmetauschern auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die Temperaturbereiche der direkten und indirekten HE unterscheiden sich nur marginal. So werden in der Literatur Temperatur/Zeit-Kombinationen von 125 °C (MAYER et al. 2009; STRAHM u. EBERHARD 2010) bis 127 °C bei 2 Sekunden (KAUFMANN et al. 2009) Haltezeit angegeben. Allerdings wird die Milch beim indirekten Verfahren langsamer erhitzt und abgekühlt, so dass die Milch länger einer Temperatur von über 90 °C ausgesetzt ist als die direkt erhitzte. Indirekt bezeichnet hierbei die Art der Wärmeübertragung vom erhitzenden Medium Wasser/Dampf auf die Milch durch die metallische Trennwand zwischen den Flüssigkeiten (Abbildung 2-9). Hierbei erfolgt keine Vermischung von Heizmedium und Milch (SPREER 2005). Durch regenerativen Wärmeaustausch zwischen der bereits erhitzten Milch und zu erhitzender Milch kann in einer Anlage zur indirekten Erhitzung ein Wärmerückgewinn von bis zu 81 % (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008) bzw. bis 90 % (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a) erreicht werden, welcher

neben den geringeren Investitions- und Betriebskosten als bei einer ESL-Direkterhitzungsanlage einen weiteren wirtschaftlichen Vorteil der indirekten Erhitzung darstellt (SPREER 2005; SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008). Ebenso entfällt das Entfernen von zugegebenem Wasser, wie es bei der Direkterhitzung notwendig ist. Die indirekte HE-Methode ist somit die kostengünstigste Methode zur Herstellung von ESL-Milch (STRAHM u. EBERHARD 2009).



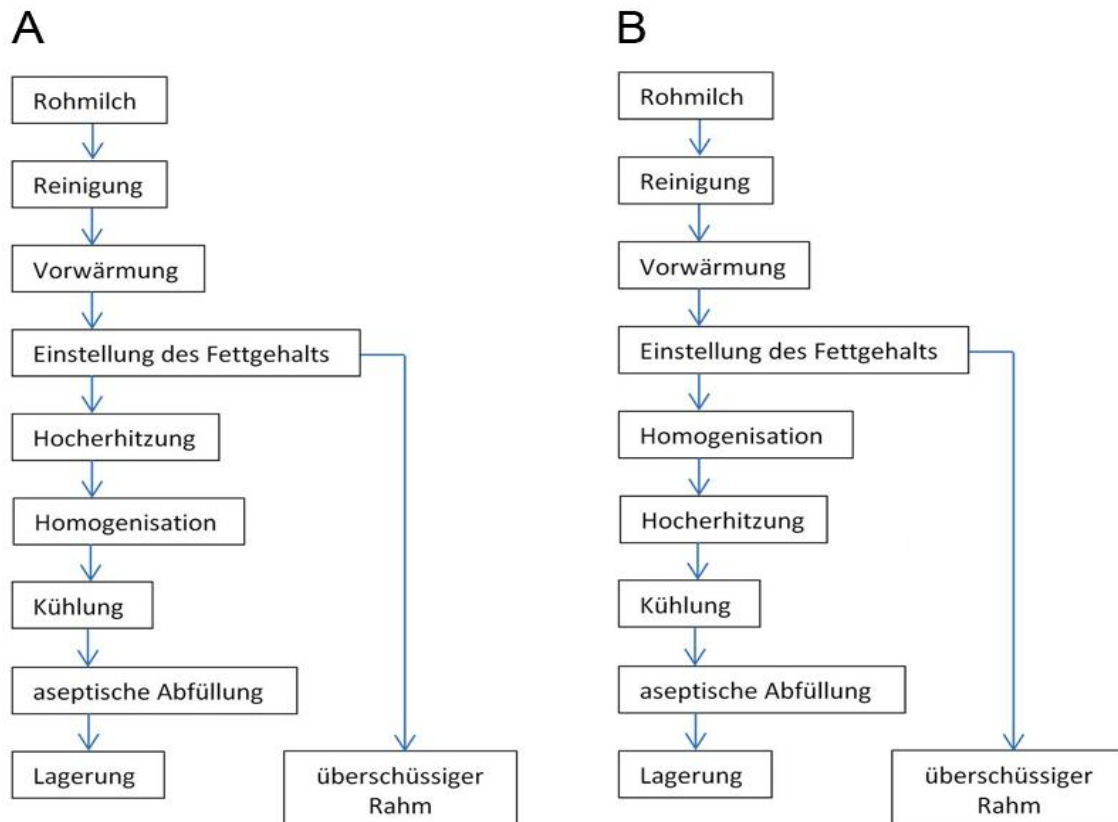
Geschmacklich unterscheidet sich die direkt und indirekt erhitzte ESL-HE-Milch von traditionell hergestellter pasteurisierter Frischmilch dadurch, dass ein leichter Kochgeschmack festgestellt werden kann. Dieser resultiert aus dem Vorhandensein von reaktiven Schwefelwasserstoff-Gruppen, die während der Erhitzung der Milch gebildet werden (KAUFMANN u. KULOZIK 2006). Durch niedrigere Bearbeitungstemperaturen ist dieser allerdings bei ESL-HE-Milch weniger ausgeprägt als bei UHT-Milch.

Ein Unterschied zwischen den beiden Methoden kann aber trotz der beim indirekten Verfahren längeren Verweilzeit bei über 90 °C (STRAHM u. EBERHARD 2009) und der damit verbundenen höheren Wärmebelastung der Milch sensorisch nicht erfasst werden (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005b; LORENZEN 2009).

Zudem führt das Vorhandensein von Sauerstoff im Kopfraum der Verpackung während der Lagerung zu allmählicher Reduktion von SH-Gruppen und damit

zur Abschwächung des hitzeinduzierten Fehlgeschmacks (KAUFMANN u. KULOZIK 2006; ALVAREZ 2009).

Hinsichtlich der Enzymaktivität ergeben sich zwischen den beiden genannten Verfahren zur Hoherhitzung nur geringe, nicht signifikante Unterschiede (KAUFMANN et al. 2009).



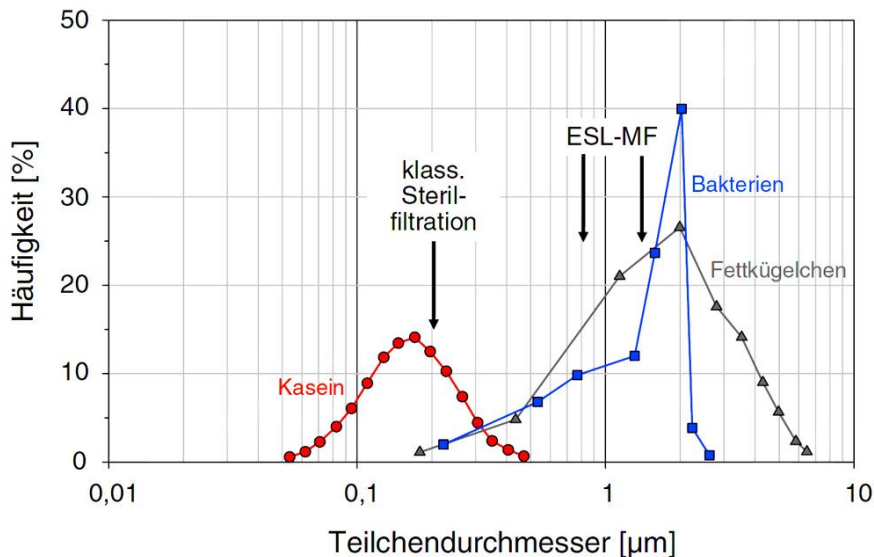
**Abbildung 2-9** Schemata der Produktion von A) direkt und B) indirekt erhitzter ESL-HE-Milch im Vergleich

#### 2.4.3.2 Mikrofiltration

Die Mikrofiltration in der Milchverarbeitung ist seit etwa 1980 bekannt (SABOYA u. MAUBOIS 2000; STRAHM u. EBERHARD 2009) und stellt ein Verfahren zur Haltbarkeitsverlängerung von Milch dar, bei dem die geschmacklichen Abweichungen von herkömmlicher pasteurisierter Frischmilch durch thermische Belastung minimiert werden sollen (STRAHM u. EBERHARD 2010). Es handelt sich hierbei also um eine Prozessalternative zur Hoherhitzung (SABOYA u. MAUBOIS 2000).

Mit Hilfe der Mikrofiltration können durch Filtermembranen Keime, Sporen und somatische Zellen von der Werkmilch auf mechanischem Wege und mit hoher Effizienz abgetrennt werden (KAUFMANN u. KULOZIK 2008) (Abbildung 2-10). Hierzu werden vorwiegend keramische Filterelemente (GRANT et al. 2005; SCHIER u. PAAR 2008) mit Porengrößen von 0,8 – 1,4 µm verwendet (SABOYA u. MAUBOIS 2000; HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a; HOFFMANN et al. 2006; RYSSTAD u. KOLSTAD 2006; KAUFMANN u. KULOZIK 2008; SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008b; KAUFMANN et al. 2009; WALTHER 2009; STRAHM und EBERHARD 2010; LORENZEN et al. 2011), womit eine Sporenreduktion von 3 – 4 log<sub>10</sub> (KAUFMANN et al. 2009) oder - 5 log<sub>10</sub> (HOFFMANN et al. 2006) erreicht wird und zudem die meisten Formen anderer Mikroorganismen ebenfalls separiert werden (LORENZEN et al. 2011). Insgesamt werden mittlerweile Keimrückhaltungsraten von 99,1 % (TÖPEL 2004), > 99,5 % (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008b), bis zu 99,999 % erzielt (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a). Hierbei entsteht keimarmes Permeat (entkeimte Magermilch) und keimreiches Retentat (Bakterienkonzentrat) (STRAHM u. EBERHARD 2010). Das Retentat kann entweder, wie der vorher abgetrennte Rahmanteil, hocherhitzt und anschließend dem Permeat wieder zugeführt oder einer anderweitigen Verwendung zugeführt werden (DEGEN et al. 1992; SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008b; KULOZIK et al. 2009). Selbst bei Rückführung des gesamten Retentats zusammen mit der Rückführung des Fettanteils nach Hoherhitzung, beträgt der Anteil der hocherhitzten Milch am Endprodukt maximal ca. 5 %, so dass ein Kochgeschmack in der ESL-MF-Milch kaum wahrgenommen werden kann (BÖHLER 2003).

Bei niedrigeren Porengrößen von zum Beispiel 0,1 µm könnten Bakterien und Sporen mit höherer Effizienz abgetrennt werden. So würden mit Porengrößen von 0,2 µm 100 % *E. coli* zurückgehalten werden (DEGEN et al. 1992) andererseits würden aber auch Fett und Casein im Retentat zurückbleiben (KAUFMANN u. KULOZIK 2008; SCHIER u. PAAR 2008).



**Abbildung 2-10** Größenverteilung verschiedener Milchbestandteile (KAUFMANN et al. 2010)

Erst ab einer nominalen Trenngrenze von 1,4 µm erfolgt eine fast vollständige Permeation der vergleichsweise kleinen Molkenproteine (KULOZIK et al. 2009). 99,0 % – 99,5 % (SABOYA u. MAUBOIS 2000) bzw. bis zu 99,6 % (KULOZIK et al. 2009) des Gesamtproteins der Milch passiert hierbei das Filterelement. Da bei diesen Porengrößen zwar Sporenbildner aufgrund ihres Volumens gut abgesondert (SABOYA u. MAUBOIS 2000) aber nicht alle Bakterien zurückgehalten werden, ist es weiterhin unumgänglich, die filtrierte Milch zu pasteurisieren (RYSSTAD u. KOLSTAD 2006; KULOZIK et al. 2009).

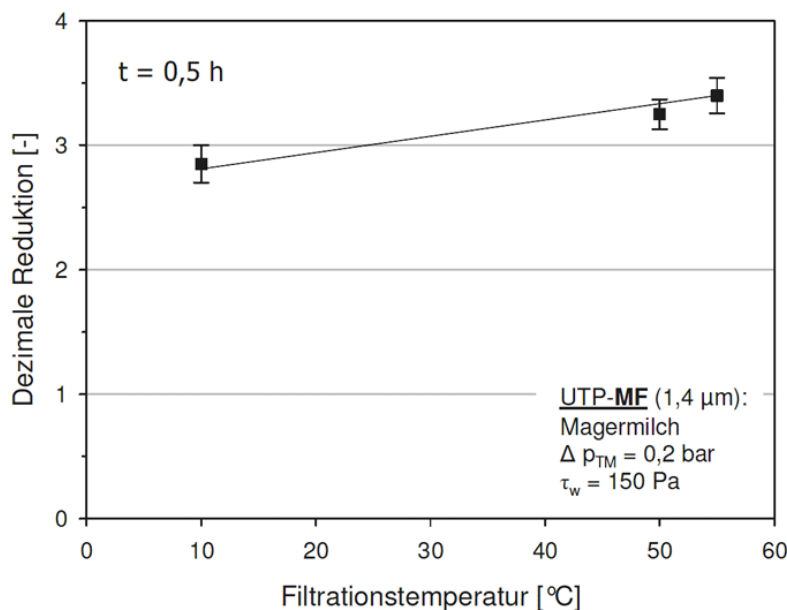
Da bei Trenngrenzen von Durchschnittlich 1,4 µm immer noch Fettkügelchen zurückgehalten werden würden (Tabelle 2-7), was zu einer raschen Verstopfung der Filtermembranen führen würde, ist es nicht möglich Vollmilch zu filtrieren. Die Milch muss also vorher entrahmt werden (RYSSTAD u. KOLSTAD 2006).

**Tabelle 2-7** Größe der bei der Mikrofiltration relevanten Milchpartikel (nach SABOYA u. MAUBOIS 2000)

Bestandteil	Größe [µm]
Casein-Mizellen	0,300 - 0,032
Bakterien	15,000 - 0,200
Fettkügelchen	6,000 - 0,200
somatische Zellen	15,000 - 6,000

Die Mikrofiltration von Magermilch findet bei Temperaturen von 50 – 55 °C statt, da in diesem Temperaturbereich die höchste Gesamtproteinpermeation erreicht wird. Elwell und Barbano (2006) erreichten auf diese Weise eine Reduktion der Gesamtkeimzahl von durchschnittlich 3,79  $\log_{10}$ .

Kulozik und Mitarbeiter (2009) und Saboya und Maubois (2000) erreichten eine Verringerung des Keimgehaltes von 3 – 3,5  $\log_{10}$  (Abbildung 2-11). Die mikrobielle Belastung des Permeats hängt also direkt von der Ausgangskeimzahl der rohen Magermilch ab (KULOZIK et al. 2009).



**Abbildung 2-11** Dezimale Keimreduktion in Abhängigkeit von der Filtrationstemperatur (KULOZIK et al. 2009)

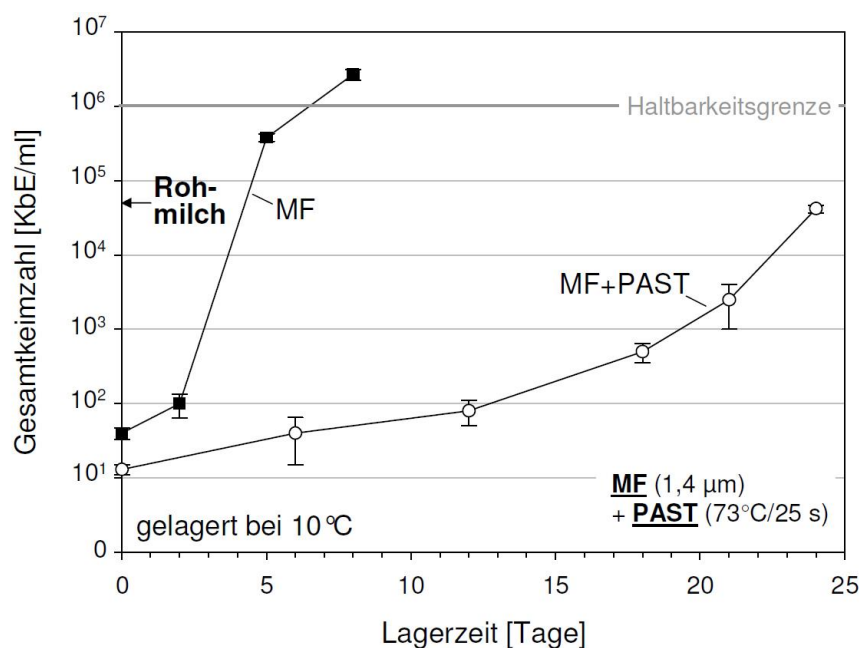
Die anschließende Pasteurisierung der mikrofiltrierten Milch verringert die Bakterienpopulation im Filtrat um weitere 1,84  $\log_{10}$  (ELWELL u. BARBANO 2006) bzw. 1 – 1,5  $\log_{10}$  (KULOZIK et al. 2009), so dass hiermit sogar eine Erniedrigung der Gesamtkeimzahl von insgesamt 5,6  $\log_{10}$  (ELWELL u. BARBANO 2006) bzw. 5 – 6  $\log_{10}$  (KULOZIK et al. 2009) erzielt wird. Damit verbleiben in Abhängigkeit von der Rohmilchqualität etwa 10 – 100 KbE/ml im Endprodukt (KULOZIK et al. 2009).

Sporen und coliforme Bakterien sind nach dieser Prozedur nicht mehr nachweisbar. Der Fettgehalt der Magermilch wird hierbei von 0,1 % auf 0,03 % reduziert (ELWELL u. BARBANO 2006).



Somatische Zellen sind zwar nach der Mikrofiltration im Permeat nicht mehr nachweisbar (SABOYA u. MAUBOIS 2000; BRUCH u. PELLEGRINO 2006; ELWELL u. BARBANO 2006), jedoch sind im Retentat nur ca. 25 % der ursprünglich vorhandenen Zellen zu finden. Drei Viertel der zuvor in der Magermilch vorhandenen somatischen Zellen gehen also beim Filtrationsprozess „verloren“. Elwell und Barbano (2006) vermuten, dass diese durch Scherkräfte bei der Filtration zerstört werden.

Die HTST-Pasteurisierung nach der Mikrofiltration bringt zwar nur eine vergleichsweise geringe zusätzliche Entkeimungswirkung, hat aber auf die Haltbarkeit des Endproduktes, wie in Abbildung 2-12 dargestellt, durch eine Floraveränderung und einen damit einhergehenden langsameren Anstieg der Gesamtkeimzahl einen großen Einfluss (KULOZIK et al. 2009).



**Abbildung 2-12** Vergleich der mikrobiellen Haltbarkeit von mikrofiltrierter (MF) und von zusätzlich HTST-behandelter (MF+PAST) Milch (KULOZIK et al. 2009)

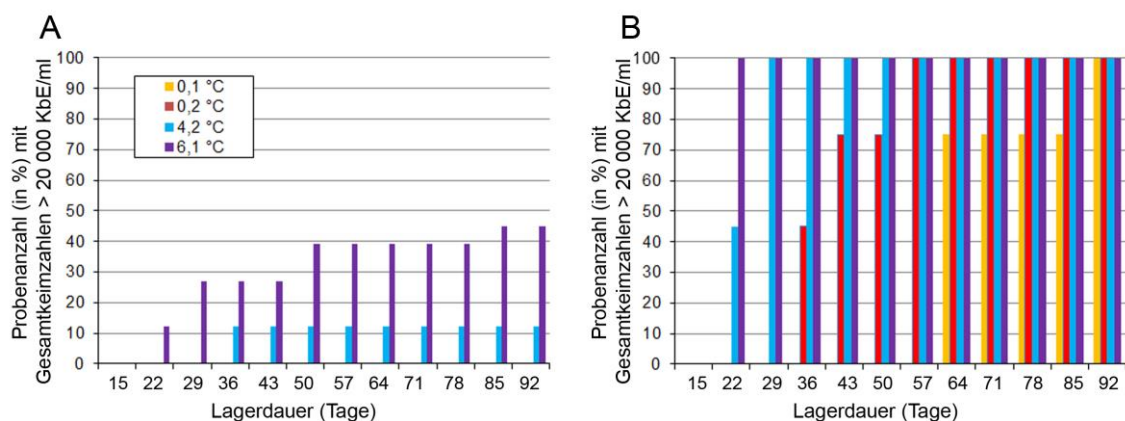
Durch die ausschließlich HTST behandelte Magermilchfraktion der ESL-MF-Milch ist das Endprodukt Peroxidase-positiv und ähnelt damit eher der traditionell hergestellten pasteurisierten Frischmilch als das hochechitzte Pendant (KAUFMANN et al. 2010). So wird mikrofiltrierte ESL-Milch auch bei der Verkostung eher als traditionell hergestellte pasteurisierte Milch eingeordnet

und unterscheidet sich demnach organoleptisch von hocherhitzter ESL-Milch (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005b).

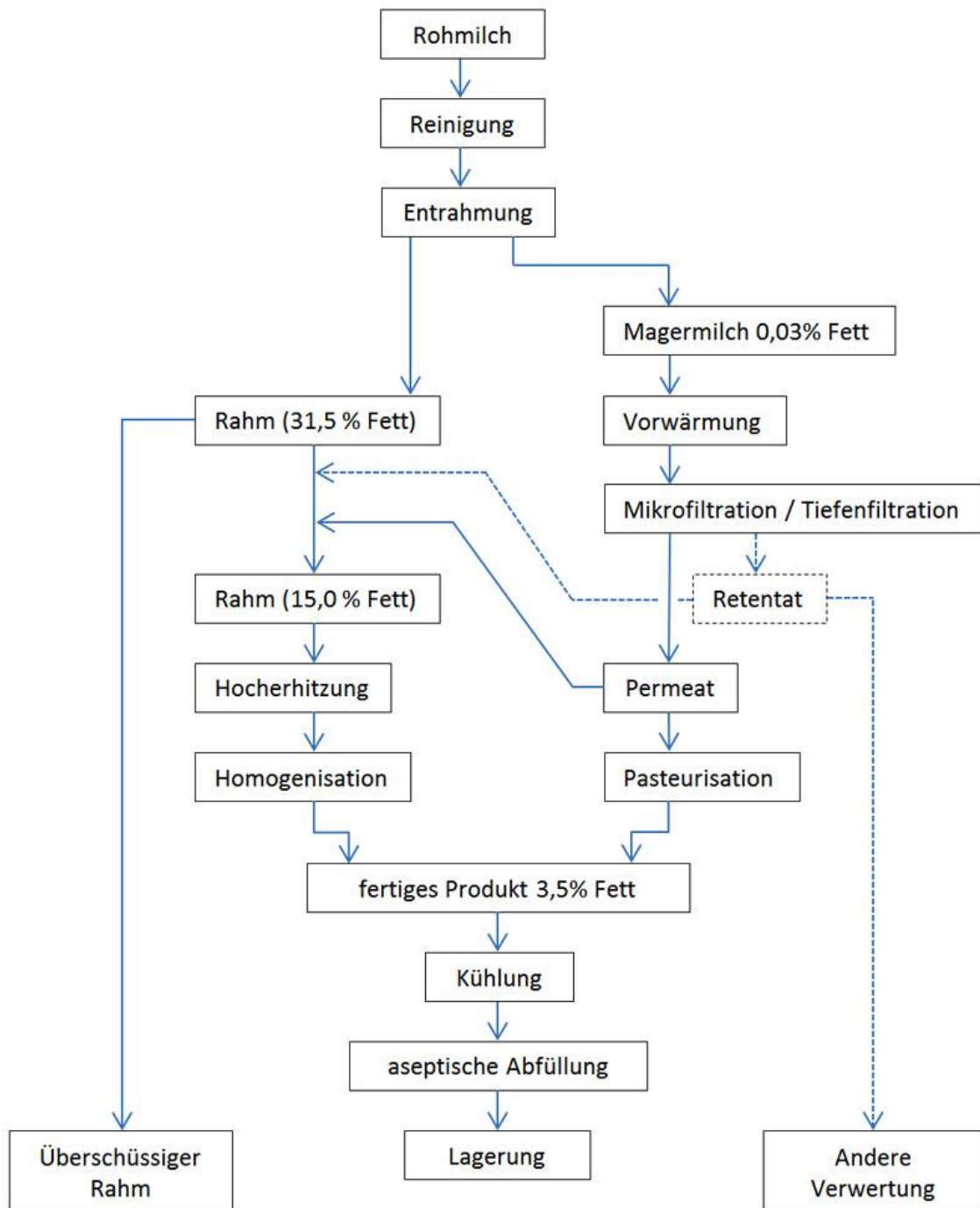
Da die Porengröße mit rund 1,4 µm Durchmesser größer ist als die Molekülgröße der Vitamine, Mineralstoffe, Proteine und Kohlenhydrate, ist bei diesem Verfahren nicht mit Nährstoffverlusten zu rechnen (WALTHER 2009). Der gesamte Proteinverlust beläuft sich auf nur 0,02 – 0,03 % (HOFFMANN et al. 2006).

Über die Haltbarkeit von ESL-MF-Milch gibt es unterschiedliche Angaben. Sie variieren von 2 Wochen bei 10 °C Lagertemperatur bis zu 4 Wochen bei Lagerung bei 5 °C (SPREER 2005). Andere Autoren geben die Lagerfähigkeit mit 18 – 21 Tagen bei 8 °C Kühlagerung an (TÖPEL 2004; HÜLSEN 2006; KAUFMANN u. KULOZIK 2008; SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a). Wobei hier nicht ausschließlich aufgrund des mikrobiellen Keimgehaltes, sondern wegen sensorischer Veränderungen des Produktes während der Lagerung die Haltbarkeit begrenzt ist (KULOZIK et al. 2009).

Die Haltbarkeit ist in hohem Maße abhängig von der Abfülltechnik (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a) und den Lagerbedingungen (Abbildung 2-13). Unumgänglich sind bei ESL-MF-Milch eine konsequente Aufrechterhaltung der Kühltette und entsprechend niedrige Temperaturen (KAUFMANN u. KULOZIK 2006; KULOZIK et al. 2009).



**Abbildung 2-13** Gegenüberstellung der Keimvermehrung von a) mikrofiltrierter plus pasteurisierter Milch (ESL-MF) und b) traditionell hergestellter pasteurisierter Milch über eine Lagerdauer von 15 – 92 Tagen und 4 verschiedenen Lagertemperaturen (nach ELWELL u. BARBANO 2006)

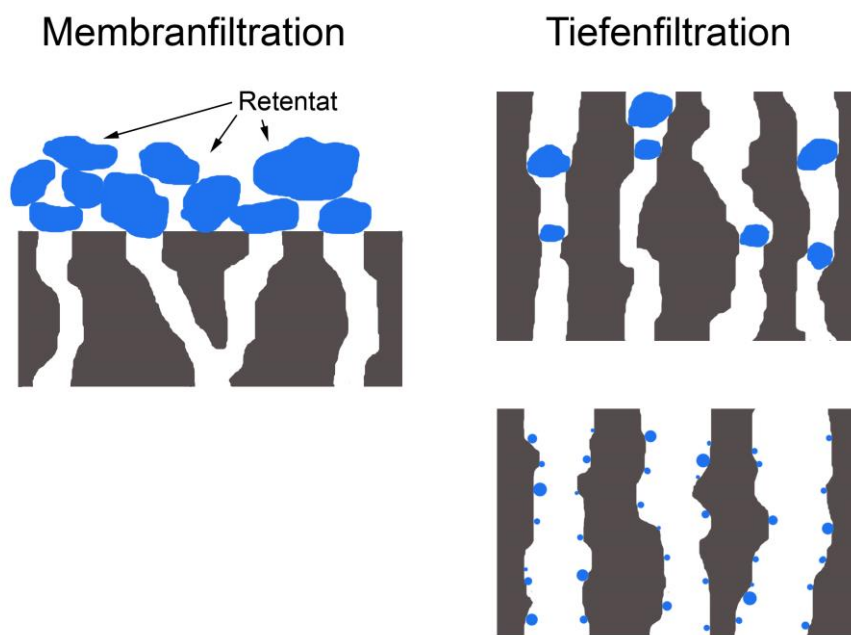


**Abbildung 2-14** Schema der Produktion von mikrofiltrierter ESL-Milch

#### 2.4.3.3 Tiefenfiltration

Der Prozess der Tiefenfiltration ist das neueste Verfahren (STRAHM u. EBERHARD 2009) und ähnelt dem der Mikrofiltration. Auch bei der

Tiefenfiltration kann nur Magermilch filtriert werden. Im Unterschied zur Mikrofiltration werden hierbei Filterelemente gewählt, die nicht nur auf rein mechanischem Wege durch die Siebwirkung der Poren Keime abtrennen, sondern zusätzlich durch Oberflächeneffekte wie elektrische Aufladungen Partikel im Inneren des Filters an der Porenwand zurückhalten. Dies führt zu einer Abtrennung von Mikroorganismen, die kleiner sind als die nominelle Porenweite des Filterelements (HÜLSEN 2006; SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008b) (Abbildung 2-15). Es kann nur unerhitzte Milch filtriert werden, da ab einer Temperatur von 65 °C die Molkeproteine denaturieren und Aggregate bilden (RAIKOS 2009), welche das Filterelement schnell verblocken würden (KÖNNEKE 2008), daher wird die Tiefenfiltration bei Temperaturen von z.B. 42 °C durchgeführt (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a; HÜLSEN 2006).

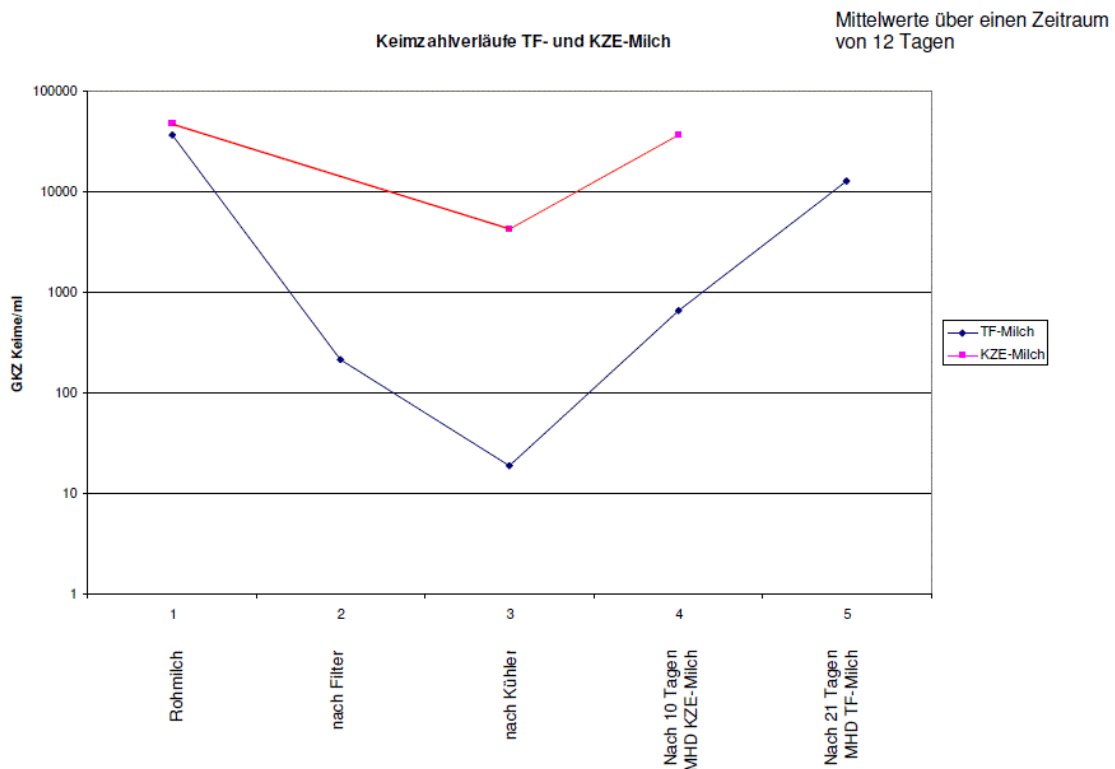


**Abbildung 2-15** Unterschiedliche Filterprinzipien von Mikrofiltration und „Dead End“ Tiefenfiltration (modifiziert nach KÖNNEKE 2008)

Die Tiefenfiltration wird in zwei Stufen (Vor- und Endfiltereinheit) mit Filterkerzen aus Polypropylen durchgeführt, wobei die Membranen nominal Trenngrenzen von 0,3 bzw. 0,2 µm haben (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008b; STRAHM u. EBERHARD 2009). Trotz der geringen nominalen Trenngrenzen der Filter werden keine Milchbestandteile einbehalten, die eine

nachweisbare Trockenmasseänderung im Endprodukt zur Folge haben (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008b).

Bei der „Dead End“ Tiefenfiltration entsteht im Gegensatz zur Mikrofiltration kein Retentat (KÖNNEKE 2008; HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a; HÜLSEN 2006; SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008b) und vor allem Sporenbildner werden in hohem Maße abgetrennt (HÜLSEN 2006). Der Wirkungsgrad ist jedoch mit einer Gesamtkeimrückhaltungsrate von ca. 99 % (KÖNNEKE 2008) bzw. 99,5 % (HÜLSEN 2006) geringer als bei der Mikrofiltration (STRAHM u. EBERHARD 2010). In Kombination mit der Pasteurisation können hier immerhin Reduktionsraten um 99,99 % erreicht werden.



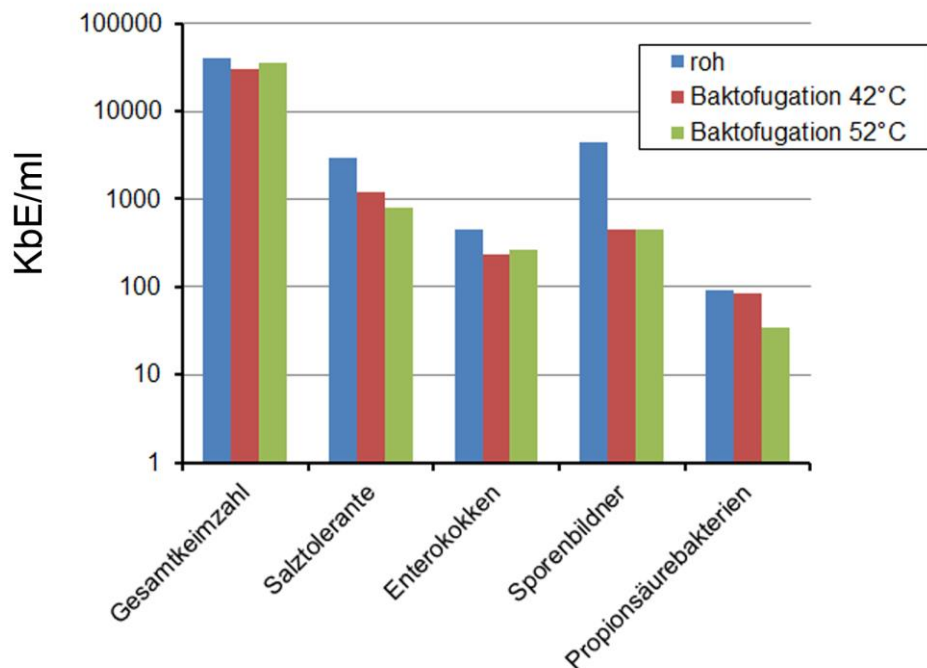
**Abbildung 2-16** Vergleich der Gesamtkeimzahlverläufe von traditionell hergestellt pasteurisierter Milch und von tiefenfiltrierter+pasteurisierter Milch (KÖNNEKE 2008)

#### 2.4.3.4 Baktofugation

Baktofugation ist eine Form der Separation, bei der Mikroorganismen aufgrund ihrer höheren Dichte in einer Zentrifuge abgeschieden werden. Dies ist besonders bei hitzeresistenten Sporen von Bedeutung (ROSENTHAL 1991;

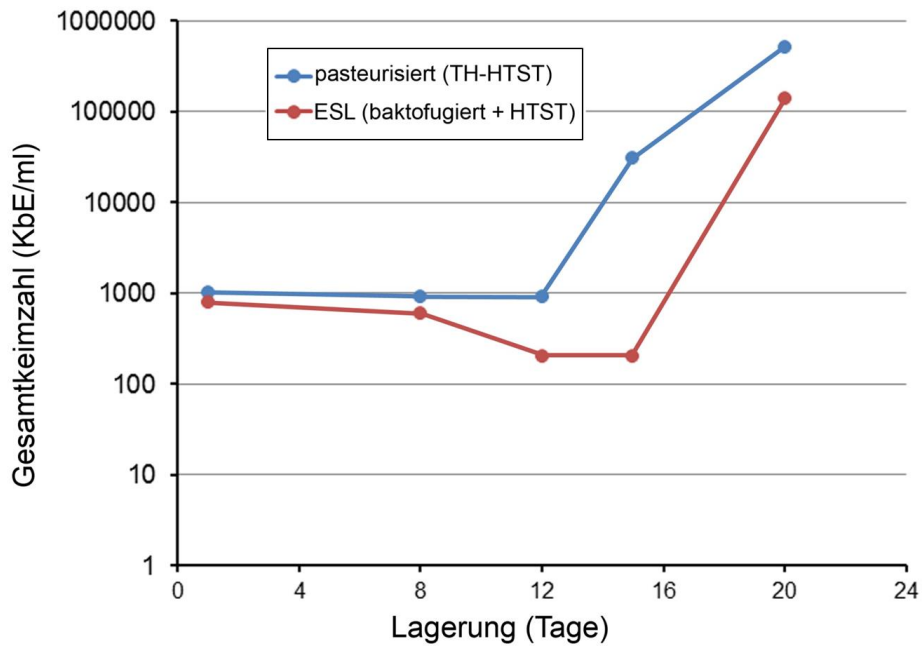
SPREER 2005), da diese im Gegensatz zu vegetativen Mikroorganismen nicht durch die Pasteurisation abgetötet werden und die Qualität von Dauermilcherzeugnissen mindern. Sporenbildende Bakterien und Sporen haben ein deutlich höheres spezifisches Gewicht als andere Milchinhaltsstoffe und können über die Zentrifugalkraft sehr gut erfasst werden (FRAHM u. GRUCHOT 2010; STRAHM u. EBERHARD 2010).

Die gereinigte Milch wird auf Temperaturen von 50 – 75 °C vorgewärmt und noch vor dem Entrahmungsseparator in die Baktofuge geleitet. So wird sichergestellt, dass die gesamte Rohmilch inklusive des Rahmanteils die Baktofuge durchläuft. Das abgetrennte Baktofugat wird anschließend hocherhitzt und nach Kühlung wieder der Milch zugesetzt oder einer anderen Verwendung zugeführt (STRAHM u. EBERHARD 2010). Bei der Baktofugation wird nur minimal in die Rohmilchflora eingegriffen, ausschließlich die Keimgruppe der Sporenbildner wird um ca. eine Zehnerpotenz verringert (Abbildung 2-17). Daher ist eine Pasteurisierung weiterhin notwendig. Das Produkt weist nach dieser Behandlung die Eigenschaften einer guten pasteurisierten Frischmilch auf (GALLMANN et al. 2001).



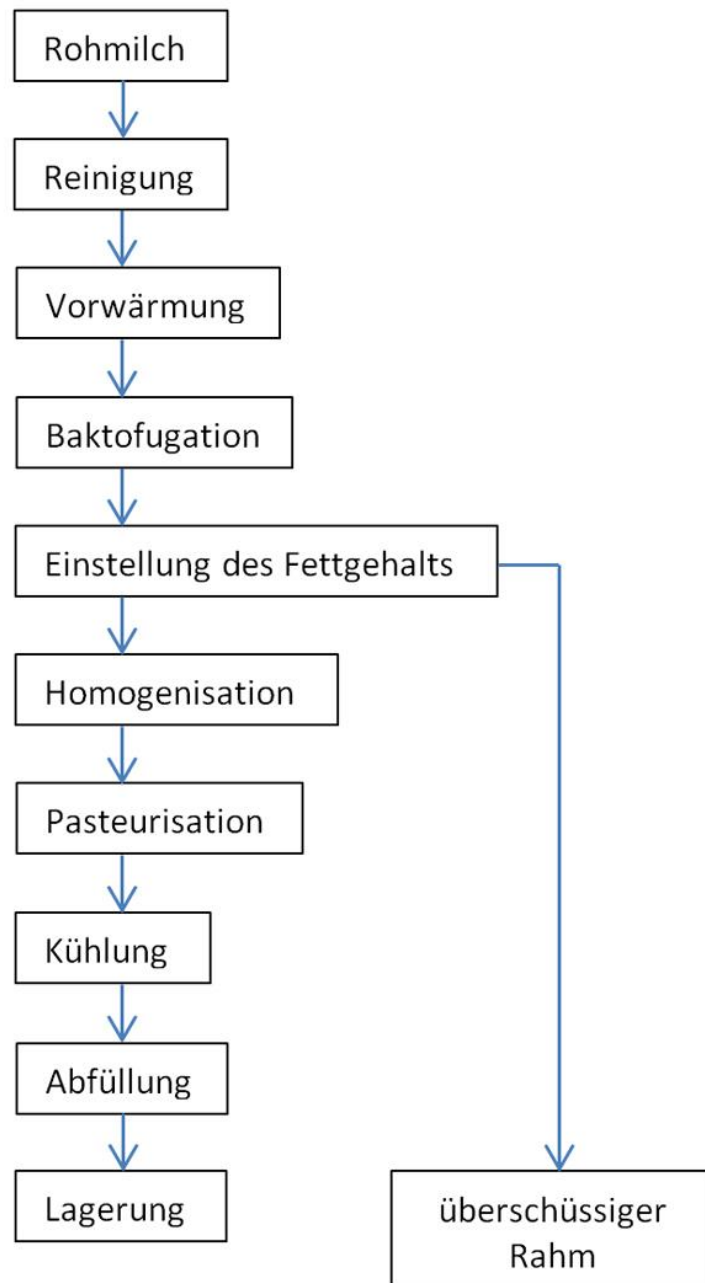
**Abbildung 2-17** Auswirkungen der Baktofugation auf die Rohmilchflora bei zwei verschiedenen Zentrifugiertemperaturen (nach GALLMANN et al. 2001)

Diese Art der ESL-Milch ist in Bezug auf Geschmack und Haltbarkeit einer herkömmlichen pasteurisierten Milch ähnlich (Abbildung 2-18) und nicht primär ein Neuprodukt (GALLMANN et al. 2001).



**Abbildung 2-18** Gesamtkeimzahl baktofugierter ESL-Milch im Vergleich zu einer traditionell hergestellten pasteurisierten Milch (modifiziert nach GALLMANN et al. 2001)

Dieses Verfahren wird bereits in der Schweiz eingesetzt, üblicherweise aber nicht deklariert. Die Haltbarkeit der pasteurisierten Milch kann jedoch nur um 1 – 2 Tage verlängert werden (DYCK 1999; GALLMANN et al. 2004).

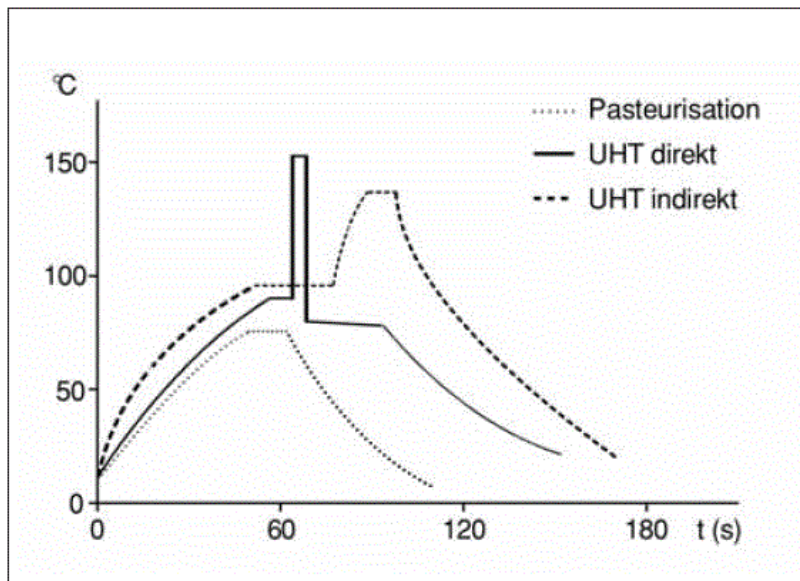


**Abbildung 2-19** Schema der Produktion von baktofugierter Milch



## 2.5 UHT-Milch

Die Ultrahocherhitzung (UHT) wurde etwa Mitte der fünfziger Jahre in Deutschland eingeführt (EBERHARD u. REHBERGER 2005). Sie ist charakterisiert durch eine Behandlung in Form kontinuierlicher Wärmezufuhr bei hoher Temperatur für kurze Zeit (nicht weniger als 135 °C bei geeigneter Heißhaltezeit), so dass bei Aufbewahrung in einer sterilen, verschlossenen Packung bei Umgebungstemperatur keine lebensfähigen Mikroorganismen oder Sporen, die sich im behandelten Erzeugnis vermehren können, vorhanden sind, und die ausreicht, um sicherzustellen, dass die Erzeugnisse nach einer Inkubation in verschlossenen Packungen bei 30 °C für 15 Tage oder bei 55 °C für 7 Tage oder nach Anwendung einer anderen Methode, bei der erwiesen ist, dass die geeignete Wärmebehandlung durchgeführt wurde, mikrobiologisch stabil sind (VERORDNUNG (EG) NR. 853/2004). Es sollte ferner keine sensorische Qualitätsminderung durch enzymatische Umsetzung im Produkt eintreten. Die UHT-Prozesse sind daher so ausgelegt, dass durch thermische Inaktivierung sämtlicher in der Rohmilch vorhandener Keime und Sporen eine Haltbarkeit von mehreren Monaten bei Raumtemperatur erreicht wird. Zudem werden unerwünschte Produktveränderungen wie Vitaminverluste oder Farbveränderungen weitgehend verhindert (KAUFMANN et al. 2009). Hierzu wird die Milch im direkten oder indirekten Erhitzungsverfahren, wie in Kapitel 2.4.3.1 beschrieben auf 135 – 150 °C für 1 – 10 Sekunden erhitzt (BELITZ et al. 2001; FRISTER 2007; KAUFMANN et al. 2009), wobei sich die Temperaturen für die UHT-Milch Produktion im indirekten Verfahren eher an der Untergrenze des vorgeschriebenen Bereiches orientieren. So werden in der Literatur Temperatur/Zeit-Kombinationen von 137 °C für 4 Sekunden bei der indirekten Variante und für 2 Sekunden bei der direkten Ultrahocherhitzung angegeben (PANFIL-KUNCEWICZ et al. 2005a). Andere Autoren dagegen berichten von Temperatur/Zeit-Kombinationen von 150 °C für 2 Sekunden beim direkten Verfahren und liegen damit im oberen Grenzbereich (STRAHM u. EBERHARD 2010). Eine grafische Darstellung der beiden Verfahren bietet Abbildung 2-20.



**Abbildung 2-20** Erhitzungsprofile von UHT-Milch im Vergleich zur traditionell hergestellten pasteurisierten Frischmilch. (STRAHM und EBERHARD 2010)

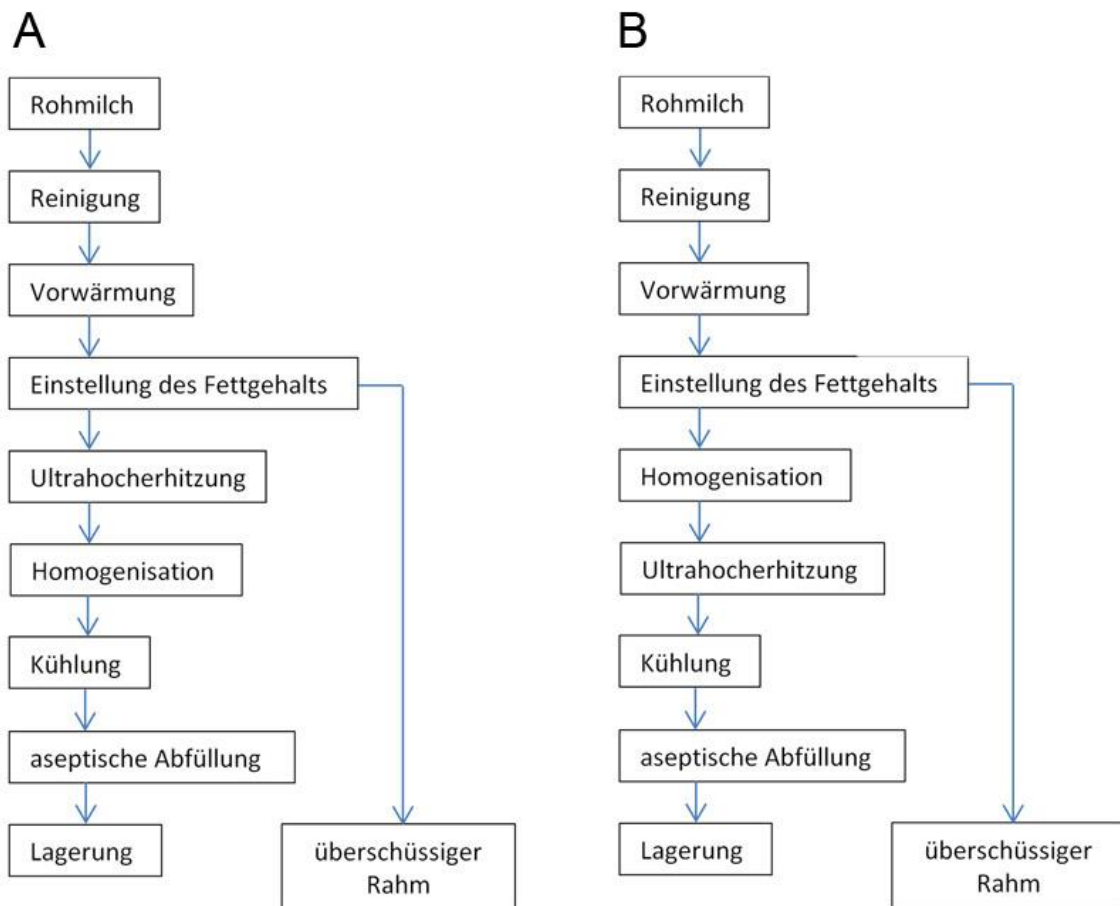
Neben dem Vorteil der langen Haltbarkeit ohne die Notwendigkeit einer Kühlagerung entsteht durch diese Art der Behandlung ein typischer Koch- bzw. Karamelgeschmack (KAUFMANN et al. 2009), der eine starke geschmackliche Abweichung zur traditionell hergestellten pasteurisierten Milch darstellt.

Das Homogenisieren geschieht üblicherweise *downstream*, da hierbei hitzeinduzierte Aggregate aufgelöst werden, was deutlich zur Langzeitstabilität des Produktes beiträgt. Besonders nach der direkten UHT-Behandlung ist auf eine aseptische Homogenisierung zu achten (JAHNKE 2008). Fester Bestandteil einer UHT-Anlage ist die aseptische Verpackungsanlage (ROSENTHAL 1991), da eine Rekontamination zum schnellen Verderb der H-Milch bei Zimmertemperaturen führen würde.

UHT-Milch muss in Deutschland durch den Vermerk „ultrahocherhitzt“ gekennzeichnet und der Buchstabe „H“ mindestens in gleicher Schriftgröße wie die Angabe der Milchsorte angegeben werden (Verordnung zur Durchführung des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007).

Für H-Milch werden Aseptik-Anlagen (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a) und spezielle Kartonverpackungen mit einer zusätzlichen

Aluminiumbeschichtung benötigt, die als Sauerstoff- und Lichtbarriere dient (STRAHM u. EBERHARD 2010).



**Abbildung 2-21** Schemata der Produktion von A) direkt und B) indirekt erhitzter UHT-Milch im Vergleich

## 2.6 Abfüllung/Kühlung

Die Abfüllung ist der letzte Teil des Herstellungsprozesses von Trinkmilch, der Einfluss auf die Haltbarkeit des Endproduktes hat. Je keimärmer die Milch nach dem Wärmebehandeln/Filtrieren bis zum Ende des Abfüllprozesses gehalten wird, desto länger ist die Haltbarkeit der Konsummilch (HÜLSEN u. RADEMACHER 2005a; STRAHM u. EBERHARD 2010). Schon bei der pasteurisierten Milch ist die Rekontamination das größte Haltbarkeitsrisiko (GALLMANN et al. 2001). Die verlängerte Haltbarkeit von ESL- oder UHT-Produkten kann nur durch die Minimierung oder Vermeidung einer Rekontamination der keimarmen bzw. -freien Milch erreicht werden

(SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a). Rekontaminationsgefährdet sind alle Anlagenteile, die im Prozessablauf *downstream* liegen (LUND et al.2000; DYCK 2004; FROMM u. BOOR 2004). Besonders gefährdet sind hierbei die Abfüllanlage und der gesamte Verpackungsbereich (SCHODER et al. 2007). Auch der Kontakt mit nicht sterilisierter Luft sollte vom Abkühlen der Milch an minimiert werden (STRAHM u. EBERHARD 2010).

Die Anlagen dafür werden in die Kategorien Standard, Clean, Ultra-Clean und Aseptik eingeteilt. Die maßgeblichen Unterschiede zwischen den Anlagen liegen im Bereich der Ventile sowie der Tanklagerausführungen und der Verpackungen selbst (LUND et al.2000). Ab der Clean Kategorie werden nach Heißwasser- oder Dampfsterilisation die produktführenden Anlagenbauteile mit Sterilluft beaufschlagt um das Eindringen von Fremdkeimen zu verhindern (STRAHM u. EBERHARD 2009; SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a). Einen Überblick über die verschiedenen Kategorien bietet Tabelle 2-8.

**Tabelle 2-8** Prozessstandards in der Abfülltechnik (nach SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a)

Kategorie	Ventiltechnik	Tanklagerausführung	Abfülltechnik	mögliche Haltbarkeiten bei $\leq 8^{\circ}\text{C}$
<b>Standard</b>	Standardventiltechnik	ohne Luftüberlagerung	Standard-Anlage	10 Tage
<b>Clean</b>	Standardventiltechnik	drucklose Tanks mit Sterilluftüberlagerung	geschlossene Anlage, Sterilluft über dem Füllorgan	14 Tage
<b>Ultra-Clean</b>	spezielle Sitzventile oder Doppelsitzventile	drucklose Tanks mit Sterilluftüberlagerung	geschlossene Anlage, Sterilluft über dem Füllorgan und Verpackungsmittel- dekontamination	> 21 Tage
<b>Aseptik</b>	Sterilventile	drucküberlagerte Steriltanks	Aseptik-Anlage	bis 30 Tage

Für die Produktion von traditionell hergestellter pasteurisierter Frischmilch mit einer Haltbarkeit von 10 – 12 Tagen reichen Anlagen der Kategorien Standard und Clean aus. Mit Abfüllanlagen der Kategorie Ultra-Clean und Aseptik, wie sie für die ESL-Milch-Produktion benötigt werden (GALLMANN et al. 2001; STRAHM u. EBERHARD 2010), können bei ESL-Milch, unter ununterbrochener Kühlagerung, Haltbarkeiten von 3 Wochen bzw. 30 Tagen gewährleistet

werden (SCHWERMANN u. SCHWENZOW 2008a; STRAHM u. EBERHARD 2009; STRAHM u. EBERHARD 2010).

Die Relevanz einer gut funktionierenden Kühlkette wird deutlich, wenn man beachtet, dass schon eine um zwei oder drei Grad Celsius zu hohe Lagertemperatur eine Haltbarkeitsverkürzung von ein bis zwei Wochen zur Folge haben kann (BERGER 2002). Zudem ist die proteolytische Aktivität in gekühlter Milch geringer als in ungekühlter (PANFIL-KUNCEWICZ et al. 2005b; MELTRETTER et al. 2008). Massa et al. (1998) und Alhelfi und Mitarbeiter (2012) zeigten auf, dass *E. coli* sich bei Temperaturen unter 5 °C in Milch praktisch nicht vermehren können und somit die Lagertemperatur einen großen Einfluss darauf hat, inwiefern sich ggf. noch oder wieder im Endprodukt befindliche Schadkeime vermehren und die Qualität des Produktes mindern können. Auch proteolytische und lipolytische Umsetzungen verlangsamen sich bei Temperaturen unter 5 °C. So lässt sich bei einer ESL-MF-Milch das Ende der Haltbarkeit bei einer Lagertemperatur von 4 °C um bis zu 6 Tage gegenüber der Lagerung bei 10 °C hinauszögern.

## **2.7 Mikrobiologische Qualitätsparameter**

### **2.7.1 Coliforme Bakterien**

Coliforme gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Diese Familie besteht aus Gram-negativen, gewöhnlich fakultativ anaeroben stäbchenförmigen Bakterien (GRAUBAUM 2010). Sie besitzen keine Oxidase, sind salz- und hitzeempfindlich und haben geringe Ernährungsansprüche (ZANGERL 2006a). Sie können beweglich oder unbeweglich sein (KRÄMER 2002). Obwohl der Begriff *Enterobacteriaceae* den Wortteil „Entero“, abgeleitet von griechischen „Enteron“ für Darm, enthält, sind Enterobakterien ubiquitär verbreitet und viele von ihnen sind keine Darmbewohner.

Der Begriff „coliforme“ Bakterien ist keine exakte taxonomische Klassifizierung, sondern ein Überbegriff für eine heterogene Gruppe von laktosespaltenden, fakultativ anaeroben Keimen, welche Säure und Gase innerhalb von 48 Stunden bei 35 °C produzieren. Eine Übersicht über die zugehörigen

Gattungen bietet Tabelle 2-9. Diese Einteilung wurde geschaffen, da man zwar schon Ende des 19. Jahrhunderts *E. coli* als Indikatorkeim für fäkale Kontamination kannte, es aber damals noch schwierig war in Anwesenheit von anderen Coliformen *E. coli* einwandfrei zu identifizieren, da diese ebenfalls Laktose fermentieren können und ähnliche phänotypische Eigenschaften aufweisen. Die Definition der Coliformen wurde 1914 vom U.S. Public Health Service als ein geeigneter Marker für Lebensmittelhygiene übernommen (FENG et al. 2002).

**Tabelle 2-9** Übersicht der milchwirtschaftlich bedeutsamen *Enterobacteriaceae* (nach RIEMELT et al. 1996)

Zuordnung	Gattung	Art
Klassische Gruppen der Coliformen	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>C. diversus</i> <i>C. freundii</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i> <i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> <i>E. agglomerans</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. sakazakii</i>
Coliform aufgrund des Lactose-spaltungsvermögens, jedoch selten vorkommend	<i>Kluyvera</i>	<i>K. ascorbata</i>
Nur wenige lactosespaltende Stämme können den Coliformen zugeordnet werden	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
	<i>Serratia</i>	<i>S. liquefaciens</i>
Keine Coliformen	<i>Shigella</i>	
	<i>Salmonella</i>	
	<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i> <i>P. myxofaciens</i>
	<i>Yersinia</i>	

Das Bakterium *E. coli* ist der einzige Indikatorkeim in der Gruppe der Coliformen, welcher ausschließlich dem Darmtrakt von Menschen und warmblütigen Tieren entstammt und auf fäkale Verunreinigung schließen lässt (FENG et al. 2002). Jedoch kann *E. coli* unter Bedingungen wie sie in einer Molkerei anzutreffen sind auch außerhalb des Verdauungstraktes überleben. Damit ist gerade bei einem positiven Nachweis in Milchprodukten nicht zwingend auf eine frische fäkale Verunreinigung zu schließen (BECKER u. TERPLAN 1987).

Andere dieser Gruppe zugehörige Keime wie *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Klebsiella* ssp. kommen ubiquitär vor und können deshalb nicht nur durch fäkale Verunreinigung in Lebensmittel gelangen (BRENNER 1986; FENG et al. 2002).

Der Nachweis von Coliformen ist ein Indikator für Trinkwasserqualität und Prozesshygiene in der Lebensmittelherstellung (FENG et al. 2002). In erhitzten Produkten sollten keine *Enterobacteriaceae* mehr vorhanden sein. Sind sie doch zu finden, deutet dies auf eine ungenügende Erhitzung oder eine nachträgliche Kontamination hin. Da die Coliformen durch ihre Laktoseverwertung bestens an das Medium Milch adaptiert sind, stellen sie den Hauptbestandteil der Enterobakterienflora in Milch und Milchprodukten dar.

Die üblichen Tests um coliforme Bakterien nachzuweisen basieren auf deren gemeinsamer Fähigkeit Laktose zu fermentieren. Das MPN-Verfahren ist hierbei ein geeignetes Mittel um sowohl die Anwesenheit als auch die Höhe der Kontamination zu bestimmen (FENG et al. 2002).

Bedingt durch die eindeutige Dominanz der coliformen Vertreter der *Enterobacteriaceae* in Milchprodukten wird bei der Untersuchung von Milch und Milchprodukten in der Regel auf den Nachweis der gesamten *Enterobacteriaceae* zu Gunsten der weniger aufwändigen Prüfung auf die laktosespaltende Fraktion verzichtet (BECKER u. TERPLAN 1987).

### 2.7.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* ist ein allgemein verbreiteter, normalerweise harmloser Darmbewohner beim Menschen und bei allen Tierarten. Es handelt sich hierbei um ein stäbchenförmiges, säurebildendes, gramnegatives und fakultativ anaerobes Bakterium, welches keine Sporen bildet. Der Durchmesser beträgt 1,1 – 1,5 µm und die Länge 2,0 – 6,0 µm.

Es wurde 1886 vom deutschen Kinderarzt Theodor Escherich entdeckt und nach ihm benannt. Der Zusatz „coli“ ist der griechische Genitiv von Colon und weist auf seine Herkunft hin. *E. coli* gehört wie alle coliformen Bakterien zur Familie der *Enterobacteriaceae*.

Normalerweise ist *E. coli* ein durchaus nützlicher Darmbewohner, der das Wachstum gefährlicher Keime im Darm unterdrückt und Vitamine synthetisiert (FENG 2012). Sein Anteil an der gesunden Darmflora beträgt etwa 1 % (MANAFI 2002).

Enterovirulente *E. coli*-Stämme (EVEC) rufen allerdings immer wieder Enteritiden hervor. Die Übertragung von EVEC erfolgt in der Regel über durch Fäkalien verunreinigte Abwässer und Lebensmittel. Unterschieden werden hier aufgrund ihrer Virulenzeigenschaften sechs Gruppen. Enteropathogene (EPEC), enteroinvasive (EIEC), enterotoxische (ETEC), enteroaggregative (EAEC), diffus adherente (DAEC) und enterohämorrhagische (EHEC) *E. coli* (MANAFI 2002; BÜLTE 2004; FENG 2012). Eingeteilt werden diese Stämme nach ihren Virulenzfaktoren. Allerdings können verschiedene Gruppen dieselben Virulenzfaktoren ausbilden. So produzieren EPEC und EHEC beide Intimin, ein Protein, welches den *E. coli* erlaubt sich an intestinale Zellen anzuheften (FENG 2012).

**EPEC**-Stämme sind charakterisiert durch den *locus of enterocyte effacement* (LEE), eine Pathogenitätsinsel, die noch weitere Virulenzgene wie das *E. coli attaching and effacing*-Gen (*eae*-Gen) enthält, durch den das Bakterium Intimin produzieren kann, mit Hilfe dessen es sich an die Zellen der Darmwand anheftet (FENG 2012). EPEC-Stämme verursachen diarrhöische Infektionen bei Kleinkindern und gelegentlich auch bei Erwachsenen. Hervorstechendstes Symptom der Erkrankung ist der heftige Durchfall, der nach einer



durchschnittlichen Inkubationszeit von 36 Stunden einsetzt. Die Bakterien heften sich fest an die Schleimhautepithelien an und verursachen charakteristische Schädigungen, indem sie die Mikrovilli zerstören ohne in die Zelle bzw. die Schleimhaut einzudringen. Die EPEC spielen in Deutschland keine epidemiologische Rolle (BÜLTE 2004). Die Mindestinfektionsdosis beträgt hier bei Erwachsenen zwischen 10 Millionen und 10 Milliarden Zellen, bei Kleinkindern ist sie wahrscheinlich wesentlich niedriger (FENG 2012).

**EIEC**-Stämme dringen in die Epithelzellen von Ileum, Caecum und Colon ein, wo sie geschwürige Veränderungen hervorrufen. Sie treten gelegentlich als Verursacher von Reisediarrhöen im Balkan und in Südostasien auf und verursachen ruhrähnliche Symptome, abdominale Krämpfe, Erbrechen und Fieber. Die Erkrankung entwickelt sich in durchschnittlich 11 Stunden. Die Infektionsdosis wird hier unterschiedlich mit  $10^6$  bis  $10^8$  (BÜLTE 2004; ZANGERL 2006b) bzw. weniger als hundert Zellen (GÄNZLE 2010; FENG 2012) angegeben. Die Krankheit ist normalerweise selbst limitierend.

**ETEC**-Stämme zeichnen sich durch eine hohe Motilität sowie hitzelabile (LT) und hitzestabile (ST) Enterotoxine aus. Sie sind die eigentlichen Erreger der Reisediarrhö, die in vielen tropischen Regionen endemisch ist. Sie besiedeln den Dünndarm und produzieren dort Toxine, welche die Flüssigkeitssekretion anregen (FARMER III u. KELLY 1992; BÜLTE 2004). Übertragen wird ETEC überwiegend über fäkal kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser (KRÄMER 2002). Die Symptome sind meist selbst limitierender, reiswasserähnlicher Durchfall ohne Blut sowie in Einzelfällen Erbrechen und hohes Fieber. Die Inkubationszeit beträgt im Mittel 26 Stunden. Um klinische Erscheinungen bei Erwachsenen auszulösen ist eine Infektionsdosis von ca.  $10^5$  Zellen erforderlich (BÜLTE 2004; FENG 2012).

**EAEC**-Stämme werden mit hartnäckigen Durchfallerkrankungen bei Kindern in Verbindung gebracht (MANAFI 2002). Der Erreger hat in Europa eine geringe epidemiologische Bedeutung. Er verursacht durch Besiedlung und Schädigung des Dickdarmes ähnliche Krankheitsbilder wie EPEC und führt vorwiegend in Entwicklungsländern zu Infektionen (KRÄMER 2002). EAEC adhärieren mit bündelbildenden Pili an Enterozyten, bilden Aggregate und bewirken durch

EAST-Enterotoxin eine sekretorische Diarrhoe, die auch blutig sein kann (MIKSITS u. HAHN 2004).

**DAEC**-Stämme verursachen eine leichte, unblutige Diarrhoe ohne Leukozyten im Stuhl. DAEC verursachte bereits Ausbrüche bei Kindern in Mexiko (MANAFI 2002).

**EHEC** beinhaltet die Stämme VTEC (Verotoxin-bildende *E. coli*) und STEC (Shigatoxin oder Shiga-like-Toxin-bildende *E. coli*) (ZANGERL 2006b). Der Begriff Verotoxin geht auf ihre Wirkung auf Affennierenzellen (Verzellen) zurück und die Begriffe Shigatoxin (Stx) bzw. Shiga-like-Toxin (SLT) auf ihre strukturelle Ähnlichkeit mit dem Shigatoxin von *Shigella dysenteriae*, dem Erreger der Bakterienruhr, ebenfalls Mitglied der Familie *Enterobacteriaceae* (KRÄMER 2002). Sie besitzen ebenso wie die Vertreter der EPEC den LEE und können Intimin produzieren. Die kennzeichnende Virulenzeigenschaft ist die Fähigkeit zur Bildung von gewebeschädigenden Zytotoxinen (Verotoxin oder Shigatoxin). EHEC-Stämme stellen eine Untergruppe der STEC dar, die dadurch charakterisiert wird, dass sie zu schwereren Verläufen mit Komplikationen führen (FENG 2012). STEC sind die virulenteste Gruppe innerhalb der durchfallauslösenden *E. coli* (WEBER et al. 2012) und zugleich die einzige bei der eine Übertragung vom Tier auf den Menschen sicher nachgewiesen wurde (Zoonose) (SUERBAUM et al. 2009). Sie sind erst seit 1982 als Erreger von Lebensmittelinfektionen bekannt. Aufgrund der Schwere des Krankheitsbildes und der Häufigkeit des Auftretens sind sie mittlerweile die wichtigste pathogene *E. coli*-Gruppe. Bei EHEC erfolgt die Infektion aufgrund der geringen Mindestinfektionsdosis von weniger als hundert Zellen auch direkt von Mensch oder Tier (BEUTIN et al. 2000) zu Mensch. Die Krankheit zeigt das klinische Bild einer hämorrhagischen Colitis mit schwachem oder gänzlich ohne Fieber, an die sich als extraintestinale lebensbedrohende Komplikationen das hämolytisch–urämische Syndrom (HUS), welches durch Nierenversagen und Hämolyse gekennzeichnet ist und die thrombozytopenische Purpura (TTP), welcher eine systemische Gerinnungsstörung zugrunde liegt, anschließen können. *E. coli* gelangen durch die orale Aufnahme über Lebensmittel oder Trinkwasser in den Körper. Sie sind säuretolerant und überleben die Magenpassage zum größten Teil, um sich danach im Dickdarm anzusiedeln

(FOSTER 2004; GYLES 2007). Die Inkubationszeit beträgt im Durchschnitt 4-6 Tage. Bei Infektion treten kolikartige Schmerzen ggf. gepaart mit Brechreiz auf. Später entwickelt sich eine hämorrhagische Diarrhö. Es gibt asymptomatische und milde verlaufende Infektionen. Erkrankte Menschen können beachtliche Mengen der Erreger ausscheiden und bei hygienewidrigem Verhalten die Umgebung und Lebensmittel kontaminieren (BÜLTE 2004).

Milch und Milchprodukte werden immer wieder als Ausgangspunkt für EHEC-Infektionen ausgemacht. So gibt es zwischen 1986 und 2001 weltweit 344 nachgewiesene Infektionen mit dem am weitesten verbreiteten EHEC-Typ O157 bei denen Milch und Milchprodukte als Ursache in Betracht kommen bzw. nachweislich die Verursacher waren (HUSSEIN u. SAKUMA 2005). Milcherzeugnisse machen einen Anteil von 2-6 % der bakteriellen, von Lebensmitteln ausgehenden Erkrankungen aus (DE BUYSER et al. 2001). Rinder sind ein natürliches Reservoir von EHEC, daher kommt es immer wieder vor, dass die Milch bereits beim Melken kontaminiert wird (REINEMANN et al. 2000; HUSSEIN u. SAKUMA 2005; GYLES 2007; ALHELFI et al. 2012). In Deutschland wurde 1989 der Erreger im Stuhl eines vierjährigen erkrankten Mädchens sowie bei den symptomlosen Eltern und in Rohmilchproben und Kot von ebenfalls symptomlosen Rindern nachgewiesen (BÜLTE 2004). Coia et al. (1994) wiesen den VTEC-Stamm O157 an der Abfüllanlage einer Molkerei nach, die in einen EHEC Ausbruch in Schottland verwickelt war. Hucker und Mitarbeiter (2006) gehen in ihrer Arbeit davon aus, dass sich jedes Jahr rund 60.000 Menschen allein in den USA durch Lebensmittel mit dem EHEC-Typ O157:H7 infizieren und ca. 50 Patienten an den Folgen der Infektion sterben.

In Deutschland wurden 2011 4903 EHEC-Fälle gemeldet, wovon 2966 auf einen massenhaften Ausbruch der Serogruppe EHEC O104 zurückzuführen waren. In 827 zusätzlichen Fällen entwickelte sich im Laufe der Infektion zudem ein HUS (RKI 2012). Dies entspricht allerdings nicht dem Durchschnitt dieser Erkrankungen in Deutschland. Zwischen 2007 und 2010 wurden jährlich im Mittel 857 EHEC und 59 HUS-Fälle gemeldet (RKI 2009; RKI 2010; RKI 2011).

### 2.7.3 Gesamtkeimzahl

Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl gibt Auskunft über die hygienisch-mikrobiologische Beschaffenheit eines Lebensmittels, ohne die Flora näher zu differenzieren.

Als mesophil (mésos – altgriech. für „mittlerer“ und philos für „liebend“) bezeichnet man Mikroorganismen, die am besten bei mittleren Temperaturen gedeihen (Abbildung 2-22). Für Mesophile gilt ein Temperaturoptimum ( $T_{opt}$ ) von über 20 bis unter 40 °C. Daneben gibt es noch Thermophile mit einem  $T_{opt}$  oberhalb dem der Mesophilen und Psychrophile, welche sich noch bei Temperaturen von unter 10 °C vermehren können (ZANGERL 2006a; KRÜGER u. SEIDLER 2010).

-10	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90 °C
Psychrophile			Mesophile		Thermophile		extrem Thermophile			

**Abbildung 2-22** Temperaturbereiche des Wachstums verschiedener Bakterien (modifiziert nach SCHINK 2007)

Es werden alle Bakterien wie auch Hefen und Schimmelpilze erfasst, die unter den gegebenen Bebrütungsbedingungen wachsen (Lebendkeimzahl). Darunter fallen alle mesophilen aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen (NAGL u. ZIEGELWANGER 2010). Keimzahlen, die über das normale Maß hinausgehen, weisen auf stark belastete Ausgangsprodukte, unsaubere Produktion oder unsachgemäße Lagerung hin. Eine hohe Gesamtkeimzahl bedeutet eine verminderte Haltbarkeit des Lebensmittels (KLZH 2012).

Nagl u. Ziegelwanger (2010) geben eine zu erwartende Gesamtkeimzahl bei Trinkmilch von bis zu max.  $10^4$  KbE/ml an.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Materialien**

#### **3.1.1 Probenmaterial**

Im Zeitraum April 2008 bis Februar 2009 wurden insgesamt 237 Proben länger frischer Frischmilch (ESL-Milch) sowie 12 Proben traditionell hergestellter Frischmilch im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen auf das Vorhandensein von Mikroorganismen untersucht.

Darunter befanden sich Produkte aus 22 deutschen-, 3 österreichischen- und einer dänischen Molkerei aus ökologischer und konventioneller Herstellung mit unterschiedlichen Fettgehalten (Tabelle 3-1) und Verpackungsgrößen. Angaben über Hersteller, Fettgehalt, Chargennummer und Mindesthaltbarkeitsdatum wurden der Verpackung entnommen.

Alle Proben wurden innerhalb des angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatums erworben und untersucht. Die Verpackungen waren in einwandfreiem Zustand.

Alle 237 Proben ESL-Milch sowie alle 12 Proben herkömmlich hergestellter Frischmilch waren pasteurisiert und homogenisiert.

210 (88,6 %) der ESL-Milch Proben waren hochehitzt und 27 Proben (11,4 %) mikrofiltriert und pasteurisiert. Dies entspricht dem prozentualen Anteil der im Einzelhandel angebotenen länger frischen Frischmilcherzeugnisse zum Zeitpunkt der Untersuchung.

**Tabelle 3-1** Übersicht über die unterschiedlichen Fettgehalte, ökologische oder konventionelle Herstellung und die Anzahl der Molkereien, deren Produkte untersucht wurden

Konsummilchproben		Fettgehalte [%]							Herstellung			Molkereien		
Herstellungsart	Anzahl	0,1	0,5	1,5	1,8	3,5	≥3,5	3,8	≥3,8	ökologisch	konventionell	D	AT	DK
ESL-HE	210	6	3	79	8	61	1	38	14	65	145	13	3	1
ESL-MF	27			11		11			5	1	26			4
TH-HTST	12			7		5				2	10			8
Gesamt	249	6	3	97	8	77	1	38	19	68	181	22*	3	1

D = Deutschland, AT = Österreich, DK = Dänemark

\* 3 Molkereien dieser Spalte stellen 2 verschiedene Produkte her und sind deshalb doppelt aufgeführt.

### 3.1.2 Nährböden und Reagenzien

#### Allgemein

Lactognost®	Heyl Chemisch-pharmazeutische Fabrik GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ringerlösung	Oxoid, Wesel, Deutschland BR 0052 G
Steriles Aqua destillatum	Bestand Institut
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma Chemie GmbH, T-2885
Traventol®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 3 %	VWR 1.07210.0250

#### Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Magermilchpulver	VWR 1.15363
Plate Count Agar	VWR 1.05463.0500

#### Nachweis von *E. coli* und coliformen Keimen

Lauryl-Sulfat-Tryptose Bouillon (LST)	VWR 1.12588.0500
---------------------------------------	------------------

#### Bakterienreferenzstamm:

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
------------------------------------	---

### 3.1.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Abzug invent FCS LAFATM	vvr Laborbau, Deutschland
accu-jet <sup>®</sup> pro, Pipettierhelfer, Brand	VWR 612-2625
Agarclav	Integra Biosciences, Biomedis Laborservice GmbH, ID-Nr. 001705
Alufolie alupro <sup>®</sup>	VWR 291-0011
Autoclav SterVis	Holzner, Stuttgart, Deutschland
Autoklavierwannen	euro-clinic München
Brutschrank B6	Heraeus 50042301
Brutschrank B12	Heraeus 50042307
Brutschrank Heraeus Thermo B 6420	Thermo Electron Cooperation 5 <sup>6</sup> 15281
Bunsenbrenner Gas-Profi 1	WLD-Tec 6.001.000
Dose-it 803	Integra Biosciences, Biomedis Laborservice GmbH, ID-Nr. 001707
Durham-Röhrchen	VWR 3110180
Glaspipette, 1 ml	VWR 612-1105
Glaspipette, 10 ml	VWR 612-1114
Handschuhe, Gr. M	VWR 11.21526
Magnetrührer Heidolph MR 3001	VWR 442-1203



Magnetrührstäbchen	VWR 442-4530
Microprocessor pH-Meter pH 537	WTW-Inolab
Petrischalen	Nerbe, Winsen/Luhe, Deutschland 09.031.0000
Pipettenspitzen, blau, 1000 µl	Fa. Sarstedt 70762
Pipettenspitzen, gelb, 200 µl	Fa. Sarstedt 760002
Präzisionswaage	Sartorius LA 2305
Reagenzgläser, 10 ml	VWR 212-1118
Schlauch für Agarclav, Ø 4 mm	biomedis A 515 100
Schlauch für Dose-it, Ø 4 mm	biomedis
Schüttelwasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland Nr. 1076591 J
Schüttler Kottermann® 4010	Kottermann, Hänigsen, Deutschland
Tecnomat 125, Plattengiesser	Integra Biosciences, Biomedis Laborservice GmbH, ID-Nr. 001704
UV-Detektion LAMAG, UV-Lampe mit dualer Wellenlänge 254/366 nm	VWR 552-0053
Vortex VF 2	JK Janke&Kunkel IKA- Labortechnik
Waage	Explorer Ohaus® Item No. E0D 120

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Probenahme**

Die insgesamt 249 Konsummilchproben wurden im Groß- bzw. Einzelhandel und zum größten Teil in und in der direkten Umgebung der Stadt Gießen erworben. Die Milch wurde unter Aufrechterhaltung der Kühlkette ins Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften in Gießen verbracht und dort bei +4 °C bis zur Untersuchung gelagert. Auch die Proben, welche später nach Inkubation bei 37 °C bzw. 21 °C untersucht wurden, wurden bis zur Untersuchung bei +4 °C aufbewahrt.

Begonnen wurde jeweils mit der Untersuchung auf den aeroben mesophilen Gesamtkeimgehalt und ggf. vorhandene *E. coli* bzw. coliforme Keime. Die Ermittlung des pH-Wertes und die Untersuchungen auf Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie der Lactoperoxidase erfolgten unmittelbar im Anschluss daran.

### **3.2.2 Spezifische Untersuchungsverfahren**

Die mikrobiologischen Untersuchungsverfahren wurden nach den Referenzverfahren der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) durchgeführt. Es wurde die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl bestimmt, sowie auf das Vorhandensein von Coliformen Keimen und *E. coli* untersucht (vgl. Kapitel 3.23 und 3.24)

Von den insgesamt 249 untersuchten Konsummilchproben wurden 211 ohne vorherige Inkubation bei 37 °C bzw. 21 °C „direkt“ untersucht. Tabelle 3-2 bietet eine Übersicht über die Herstellungsarten und Fettgehalte der untersuchten Proben.

**Tabelle 3-2** Übersicht über die Herstellungsarten und Fettgehalte der 211 direkt untersuchten Proben

Fettgehalte [%]	ESL-HE n = 175	ESL-MF n = 24	TH-HTST n = 12
0,1	6	0	0
0,5	3	0	0
1,5	63	10	7
1,8	6	0	0
3,5	56	10	5
3,8	28	0	0
mind. 3,8	13	4	0

Im Rahmen einiger Zusatzuntersuchungen wurden 29 Proben vor Beginn der Untersuchungen für 24 h bei 37 °C inkubiert und weitere 9 Proben bei 21 °C für 6 Tage gelagert (Tabelle 3-3). Die Untersuchungen im Anschluss an die Inkubation unterschieden sich nicht von denen ohne vorherige Inkubation. Auch bei diesen Proben wurden sämtliche Untersuchungen innerhalb des angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatums durchgeführt.

**Tabelle 3-3** Übersicht der Proben welche direkt bzw. nach Inkubation untersucht wurden

Herstellungsart	Gesamt	direkt untersucht	nach Inkubation untersucht	
			37 °C / 24 h	21 °C / 6 d
ESL-HE	210	175	26	9
ESL-MF	27	24	3	0
TH-HTST	12	12	0	0
	249	211	29	9

### 3.2.3 Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Die Ermittlung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl in nicht vorinkubierter Konsummilch erfolgte mittels Kochschem Gußplattenverfahren in Anlehnung an Methode L 01.00-5 „Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten – Referenzverfahren“ (§ 64 LFGB - Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren).

Hierzu wurden die Proben nach L 01.00-1 „Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen; Teil 5: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Milch und Milcherzeugnissen“ (§ 64 LFGB - Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) direkt nach 25-maligem Umdrehen der ungeöffneten Originalverpackungen vorsichtig geöffnet und das Probenmaterial unter sterilen Bedingungen mittels Pipetten entnommen.

Danach wurde die entnommene Milchprobe mit viertelstarker Ringer-Lösung nach L 01.00-1 Unterpunkt 5.2.2 bis auf  $10^{-3}$  verdünnt. Von diesen Verdünnungsstufen  $10^0$  (unverdünnt),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  wurden jeweils 1 ml auf 2 Petri-Schalen (Doppelansatz) mit Hefeextrakt-Trypton-Glucose-Agar (Plate-Count-Agar) mit 1 % Magermilchzusatz in der Platte durch leichtes Schwenken vermischt.

Die Petri-Schalen wurden mit dem Deckel nach unten bei 30°C über 72 Stunden im Inkubator bebrütet und anschließend die Anzahl der Kolonien auf den einzelnen Platten ausgezählt.

In die Bewertung einbezogen wurden ausschließlich solche Petri-Schalen mit einer Anzahl zwischen 10 und 300 Kolonien pro Schale.

Die Gesamtkeimzahl der Probe wurde nach der Formel zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittels nach L 01.00-5 berechnet.

Formel zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittels nach L 01.00-5

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 * 1 + n_2 * 0,1} * d$$

$\bar{c}$  = Anzahl aerober mesophiler Koloniebildender Einheiten je ml

$\sum c$  = Summe aller Kolonien der Petri-Schalen, die zur Berechnung herangezogen wurden

$n_1$  = Anzahl der Petri-Schalen der niedrigsten Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden

$n_2$  = Anzahl der Petri-Schalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden

$d$  = Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe, hierbei handelt es sich um die auf  $n_1$  bezogene Verdünnungsstufe

Daraus (höchste Verdünnungsstufe  $10^{-3}$ ) ergibt sich rechnerisch eine maximal bestimmbare Anzahl von 30.000 bzw.  $3 \cdot 10^4$  KbE/ml.

Für die Ermittlung der Gesamtkeimzahlen nach Inkubation wurde nach demselben Schema vorgegangen, jedoch wurden hier Verdünnungsreihen bis  $10^{-8}$  angelegt und teilweise auch Petri-Schalen mit mehr- oder weniger als 10-300 KbE/ml in die Berechnung einbezogen, sofern sie auszählbar waren.

### 3.2.4 Quantitative Bestimmung von *E. coli* und coliformen Keimen

Die Untersuchung auf *Escherichia coli* in den Proben erfolgte nach Methode L 01.00-54 „Bestimmung der *Escherichia coli* in Milch und Milchprodukten – Fluoreszenzoptisches Verfahren mit paralleler Bestimmung coliformer Keime“ (§ 64 LFGB - Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren).

Hierzu wurden die Proben nach L 01.00-1 „Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen; Teil 5: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Milch und Milcherzeugnissen“

(§ 64 LFGB - Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren). direkt nach 25-maligem Umdrehen der ungeöffneten Originalverpackungen vorsichtig geöffnet und das Probenmaterial unter sterilen Bedingungen mittels Pipetten entnommen.

Nun wurden mit viertelstarker Ringerlösung dezimale Verdünnungsreihen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  angelegt. Anschließend wurden im Dreifachansatz jeweils 1 ml unverdünntes Probenmaterial bzw. pro Verdünnungsstufe jeweils 1 ml Probenmaterial in sterile, mit Durham-Röhrchen beschickte und mit jeweils 10 ml selektivem Laurylsulfat-Tryptose-Nährmedium mit Zusatz von Tryptophan und 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (LST/MUG-Nährmedium) einfacher Konzentration befüllte Kulturröhrchen ohne Eigenfluoreszenz pipettiert.

Die Probe wurde nun durch vorsichtiges Schwenken mit dem Nährmedium gut durchmischt und im Brutschrank bei 30 °C für 48 Stunden bebrütet. Alle Kulturröhrchen wurden nach 24 h und 48 h auf Gasbildung im Durham-Röhrchen sowie auf Fluoreszenz durch Anregung mit langwelligem UV-Licht bei 366 nm und 4 Watt untersucht. Hierbei galt eine deutliche Gasbildung im Durham-Röhrchen als „coliforme Keime positiv“ und eine hellblaue Fluoreszenz bei Anregung durch langwelliges UV-Licht als „*E. coli* positiv“.

Zu jeder Probenreihe wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle wurde mit dem *Escherichia coli* Stamm ATCC 25922 beimpft, die Negativkontrolle wurde keimfrei (unbeimpft) belassen.

### **3.2.5 Nachweis des Enzyms alkalische Phosphatase**

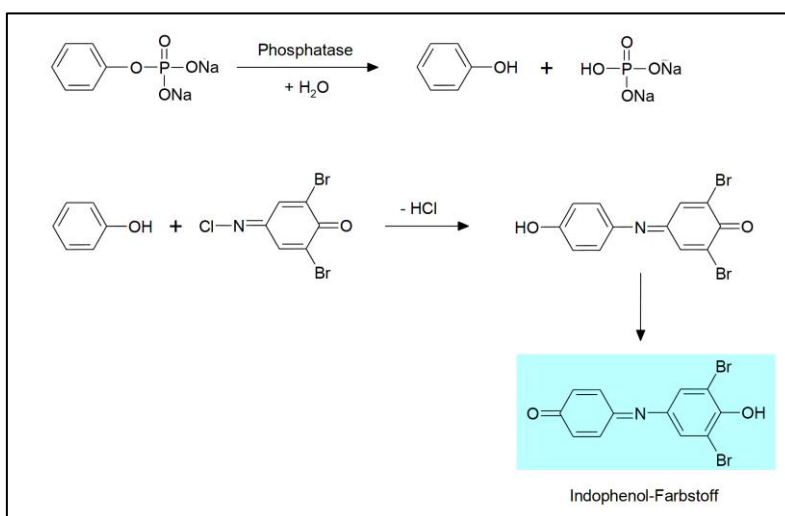
Die alkalische Phosphatase ist ein in der Milch enthaltenes originäres Enzym, welches durch Spaltung der Phenylester der Phosphorsäure Phenol erzeugt. Dieses Phenol kann mit geeigneten Reagenzien durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden (Abbildung 3-1). Da die alkalische Phosphatase ein sehr hitzelabiles Enzym ist, welches schon bei Temperaturen von ca. 60 °C irreversibel inaktiviert wird, kann sie als Nachweis einer ordnungsgemäß durchgeführten Pasteurisierung herangezogen werden indem nachgewiesen wird, dass die Phosphatase nicht mehr fähig ist aus Estern Phenol abzuspalten.

Zu diesem Nachweis wurde das Produkt Lactognost® der Firma Heyl verwendet. Hierzu wurden in einem Reagenzglas jeweils 1 Tablette Lactognostreagenz I (Dinatriumphenylphosphat) als Substrat und eine Tablette Lactognostreagenz II (alkalischer Puffer), zum Erreichen des Wirkoptimums der Phosphatase von pH 9,0 – 9,6, in 10 ml auf 37 °C erwärmtem destilliertem Wasser aufgelöst.

Direkt im Anschluss daran wurde 1 ml der zu prüfenden Milch hinzu pipettiert und nach Durchmischen eine Stunde lang im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37 °C gehalten. Jede Pipette wurde nur einmal verwendet. Nach Ablauf dieser Zeit wurde ein gestrichener Dosierlöffel Lactognostreagenz III (Dibrominonchlorid) als Phenol-Nachweisreagenz hinzugegeben, gut durchmischt und die Probe 10 Minuten lang stehen gelassen, anschließend nochmals gut durchmischt und nach weiteren 3-5 Minuten wurde die Probe auf Umfärbung untersucht.

Bei inaktivierter alkalischer Phosphatase zeigte sich eine rötlich-braune, allmählich in grau übergehende Färbung. Als Negativkontrolle wurde hier UHT-Milch verwendet.

Bei aktiver alkalischer Phosphatase zeigte sich eine eindeutige blau-Färbung. Als Positivkontrollen dienten hierbei an der Lehr- und Forschungsstation des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommene Rohmilchproben.



**Abbildung 3-1** Schema der Reaktion des Phosphatase-Tests

### 3.2.6 Nachweis des Enzyms Lactoperoxidase

Die Lactoperoxidase (LP) ist ein originärer Bestandteil der Milch mit antimikrobieller Wirkung. Die LP als Enzymprotein setzt zusammen mit Wasserstoffperoxid und Thiocyanat, welche in der Rohmilch in unterschiedlicher Konzentration vorkommen, durch Katalyse der Oxidation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{SCN}^-$  als Reaktionsprodukt das Hypothiocyanit-Anion ( $\text{OSCN}^-$ ) frei, das die Sulfhydrylgruppen von mikrobiellen Enzymen bzw. von Proteinen der Zytoplasmamembranen der Bakterienzellen oxidiert und damit bakteriostatisch bzw. bakterizid wirkt (MICKELSON 1979; TÖPFL et al. 2006). Sie setzt also katalytisch Sauerstoff aus Peroxiden um. Diese Reaktion kann mit einem einfachen Test nachgewiesen werden.

Die LP wird bei Erhitzung auf 85 °C für 4 Sekunden inaktiviert, wodurch sie als Nachweis für eine Temperaturbelastung oberhalb der normalen Pasteurisierung herangezogen werden kann.

Aufgrund der hohen Toxizität (WANG et al. 2007; BAGCHI u. WAXMAN 2008; ADEDARA et al. 2010; REGULSKA et al. 2010; RUIZ et al. 2011), wurde davon abgesehen den Peroxidase-Nachweis dauerhaft mit Traventol® (2-Ethoxyethanol) als Testsubstanz durchzuführen. Nach einigen Vergleichsversuchen zur Validierung wurde statt dessen der Peroxidase-Nachweis an Milchproben regelmäßig mit einer Substratlösung aus Wasserstoffperoxid und TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) durchgeführt, welches als ungiftig gilt (MARQUEZ u. DUNFORD 1997; GAO et al. 2011) und im Labor ohnehin vorhanden war.

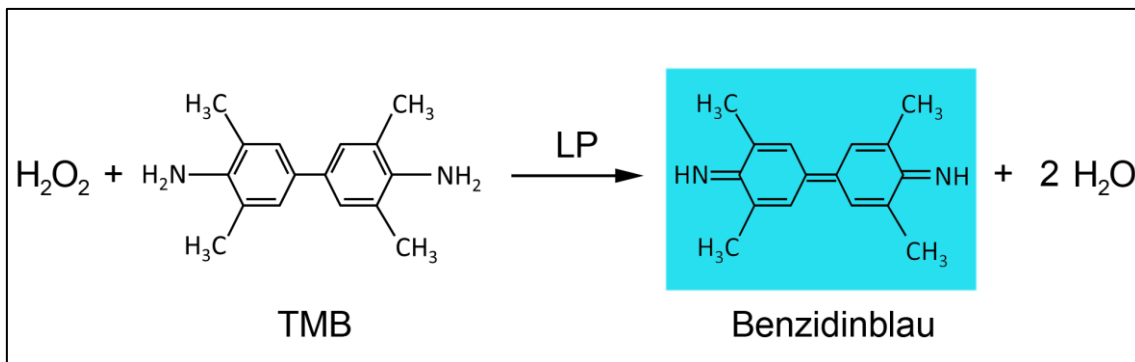
In der Literatur ist diese Form des Lactoperoxidase-Nachweises schon ab 1982 erwähnt (JOSEPHY et al. 1982; SHIN et al. 2000; ISOBE et al. 2011).

Zum Nachweis der Aktivität der Lactoperoxidase mittels TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  Substratlösung wurden 10 ml Wasserstoffperoxid-Citratpufferlösung und 5 µl TMB hergestellt und ebenso wie die zu untersuchende Milch auf Temperaturen zwischen 20 und 25 °C gebracht. Nun wurde 1 ml TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  Substratlösung in 5 ml Milch pipettiert und gut durchmischt.



Zum Nachweis der Aktivität der Lactoperoxidase mittels Traventol® Reagenz wurden 5 ml der zu beprobenden Milch auf 20 °C gebracht und anschließend mit 0,5 ml des Traventol®-Reagenz versetzt und gut durchmischt.

In Anwesenheit von aktiver Lactoperoxidase setzte diese das farblose TMB in das Oxidationsprodukt Benzidinblau um, wodurch sich die Probe im Reagenzglas gänzlich verfärbte (Abbildung 3-2). Das Ergebnis wurde nach 1 Minute abgelesen. Es wurde hier nur qualitativ der Farbumschlag festgestellt, eine photometrische Untersuchung wurde nicht durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten hierbei an der Lehr- und Forschungsstation des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommene Rohmilchproben.



**Abbildung 3-2** Schema der Oxidation von TMB

Bei inaktivierter Lactoperoxidase verfärbte sich die Probe nicht. Als Negativkontrolle wurde hier UHT-Milch verwendet.

### 3.2.7 Statistische Verfahren

Die Daten wurden in Excel-Tabellen erfasst. Die statistische Analyse sowie die graphische Darstellung erfolgten ebenfalls mittels des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft® Excel® 2010. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der deskriptiven Statistik, wobei Minima, Maxima, der geometrische Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt wurden.

Die Prüfung der annähernd normalverteilten Daten auf statistische Signifikanz erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests, wobei  $p < 0,05$  als signifikant galt. Folgende Fragestellungen wurden auf ihre statistische Signifikanz untersucht:

- Vergleich der Gesamtkeimgehalte der ESL-Varianten mit denen traditionell hergestellter HTST-Milch
- Vergleich der pH-Werte der bei 37 °C inkubierten, der bei 21 °C gelagerten sowie der ohne Unterbrechung der Kühlkette untersuchten Milchproben.
- Vergleich der mikrobiologischen Qualität von Milchproben konventioneller und ökologischer Herstellung.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Untersuchungen ohne vorherige Inkubation**

Es wurden 211 Milchproben auf ihren aeroben mesophilen Keimgehalt, auf Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Lactoperoxidase sowie auf ihren pH-Wert untersucht.

Unter diesen Proben befanden sich 175 ESL-HE-, 24 ESL-MF- und 12 traditionell hergestellte Frischmilchproben. Die Proben stammten aus 26 verschiedenen Molkereien in Deutschland, Österreich und Dänemark und beinhalteten auch 54 Proben aus ökologischer Herstellung.

#### **4.1.1 Nachweis des Enzyms alkalische Phosphatase**

Alle Proben wiesen ein negatives Ergebnis auf Aktivität der alkalischen Phosphatase auf, d.h. es ergeben sich keine Hinweise auf eine Re-Kontamination mit Rohmilch.

#### **4.1.2 Nachweis des Enzyms Lactoperoxidase**

Die Lactoperoxidase war bei allen hocherhitzten Proben inaktiviert. Bei den ESL-MF-Proben und bei allen Proben der traditionell hergestellten Frischmilch konnte Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1** Übersicht über die Ergebnisse der Prüfung auf Aktivität von alkalischer Phosphatase bzw. Lactoperoxidase

Enzymaktivität	ESL-HE n = 175	ESL-MF n = 24	TH-HTST n = 12
Alkalische Phosphatase aktiv	0	0	0
Alkalische Phosphatase inaktiv	175	24	12
Lactoperoxidase aktiv	0	24	12
Lactoperoxidase inaktiv	175	0	0

#### 4.1.3 Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 4-2 und Abbildung 4-1 dargestellt.

Bei 99,4% der ESL-HE-Proben konnte ein Gesamtkeimgehalt von unter 10 KbE/ml nachgewiesen werden. Lediglich eine der 175 Proben wies einen Keimgehalt von über  $10^3$  KbE/ml auf.

Ein aerober mesophiler Gesamtkeimgehalt von unter 10 KbE/ml konnte bei den ESL-MF-Proben bei 79,2 % festgestellt werden und auch hier wurde nur eine Probe mit mehr als  $10^3$  KbE/ml ermittelt. Bei 4 Proben lag der Keimgehalt zwischen  $>10$  und  $10^3$  KbE/ml.

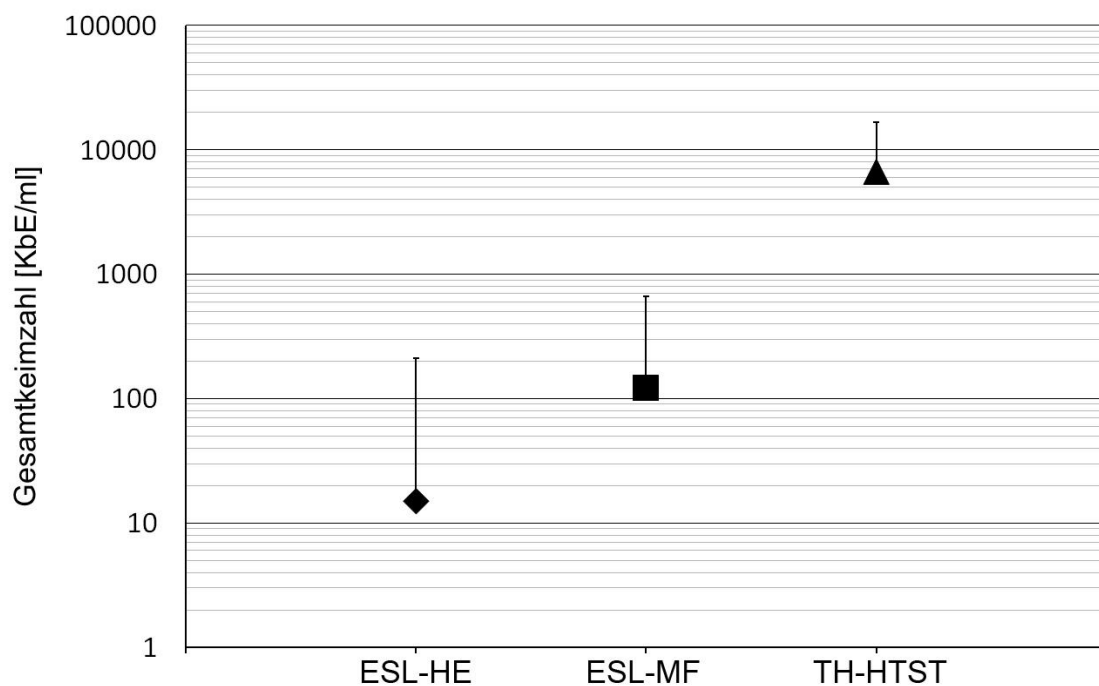
Unter den Proben traditionell hergestellter pasteurisierter Milch wurde keine Probe mit weniger als 10 KbE/ml ermittelt. Hier lag der niedrigste Wert mit einer Probe zwischen 10 und  $10^2$  KbE/ml. Bei 50 % der Proben lag der Keimgehalt zwischen  $10^3$  und  $10^4$  KbE/ml. 2 Proben wiesen einen Keimgehalt zwischen  $10^4$  und  $3 \cdot 10^4$  KbE/ml auf.

Damit lagen die Gesamtkeimgehalte der ESL-Varianten signifikant ( $p < 0,05$ ) unter denen der traditionell hergestellten HTST-Milch.

## Ergebnisse

**Tabelle 4-2** Ergebnisse der Untersuchung von 211 Konsummilchproben auf ihren aeroben mesophilen Keimgehalt

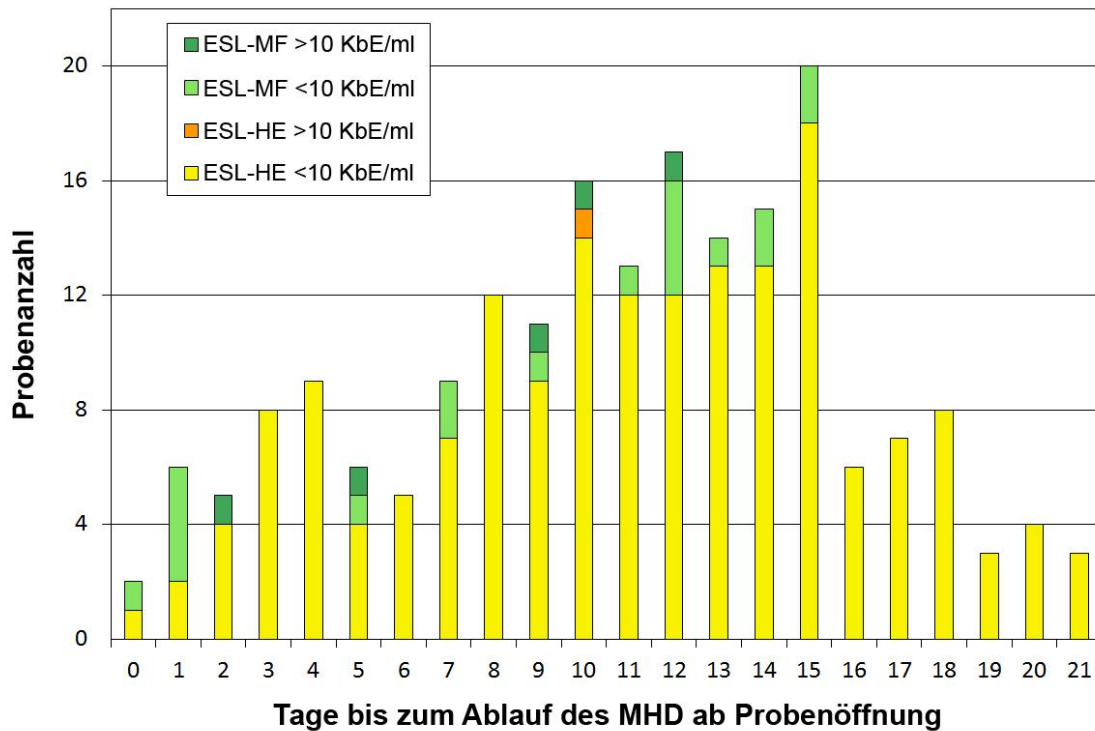
aerobe mesophile Gesamtkeimzahl [KbE/ml]	ESL-HE n = 175	ESL-MF n = 24	TH-HTST n = 12
$\leq 10$	174 (99,4 %)	19 (79,2 %)	0
$>10 - \leq 10^2$	0	3 (12,5 %)	1 (8,3 %)
$>10^2 - \leq 10^3$	0	1 (4,2 %)	3 (25 %)
$>10^3 - \leq 10^4$	1 (0,6 %)	1 (4,2 %)	6 (50 %)
$>10^4 - \leq 3 \cdot 10^4$	0	0	2 (16,7 %)
$> 3 \cdot 10^4$	0	0	0



**Abbildung 4-1** Mittlere Gesamtkeimzahlen mit Standardabweichungen von 211 untersuchten Konsummilchproben (ESL-HE n = 175, ESL-MF n = 24, TH-HTST n = 12)

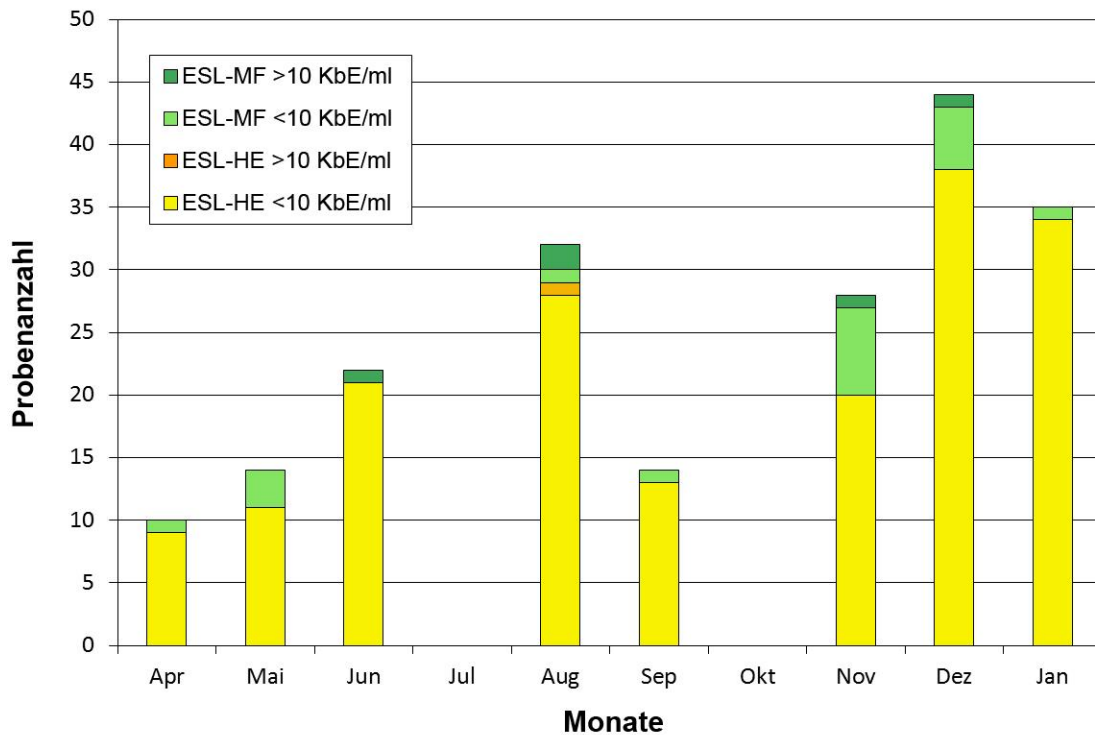
Es konnten keine Zusammenhänge von nachgewiesenen Gesamtkeimzahlen zu unterschiedlichen Fettgehalten, Molkereien oder biologischer Herstellung

festgestellt werden. Außerdem war kein Zusammenhang zwischen Gesamtkeimzahlen und Lagerdauer erkennbar (Abbildung 4-2).



**Abbildung 4-2** Ergebnisse der Untersuchung von 199 ESL-Konsummilchproben auf ihren aeroben mesophilen Gesamtkeimgehalt, nach Tagen Resthaltbarkeit sortiert.

Auffällig war jedoch, dass zwei von drei im Monat August 2008 untersuchten ESL-MF-Milchproben Gesamtkeimzahlen von über 10 KbE/ml aufwiesen. Die einzige der 175 untersuchten ESL-HE-Milchproben, die einen Gesamtkeimgehalt von über 10 KbE/ml aufwies, lag ebenfalls im August 2008 (Abbildung 4-3).



**Abbildung 4-3** Ergebnisse der Untersuchung von 199 ESL-Konsummilchproben auf ihren aeroben mesophilen Gesamtkeimgehalt, nach Monaten April 2008 – Januar 2009 sortiert

#### 4.1.4 Untersuchung auf das Vorhandensein von *E. coli* und coliformen Keimen

Es konnte in keiner Probe die Anwesenheit von *E. coli* oder coliformen Keimen nachgewiesen werden (Tabelle 4-3).

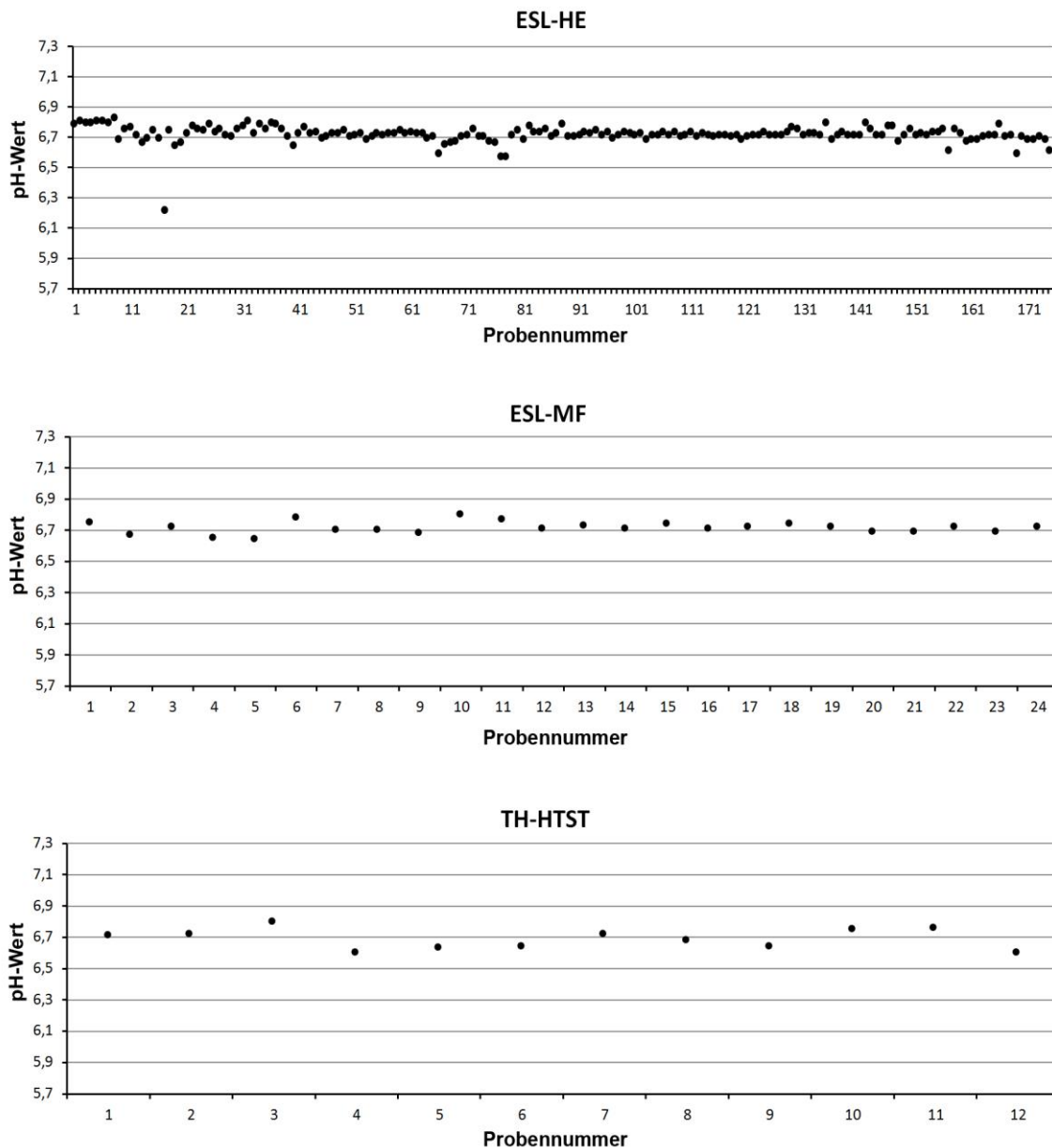
**Tabelle 4-3** Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung von 211 Milchproben auf das Vorhandensein von *E. coli* und coliformen Keimen

	ESL-HE n = 175	ESL-MF n = 24	TH-HTST n = 12
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
coliforme Keime	0	0	0

#### 4.1.5 pH-Wert-Messung

Die geometrischen Mittelwerte der ermittelten pH-Werte der Proben von ESL-HE-, ESL-MF- und TH-HTST-Milch waren mit  $\text{pH } 6,71 \pm 0,06$ ,  $\text{pH } 6,70 \pm 0,04$  und  $\text{pH } 6,68 \pm 0,07$  nahezu identisch.

Die gemessenen pH-Werte sind in Abbildung 4-4 grafisch dargestellt.



**Abbildung 4-4** Grafische Darstellung der pH-Werte von insgesamt 211 Konsummilchproben (ESL-HE  $n = 175$ , ESL-MF  $n = 24$ , TH-HTST  $n = 12$ )



## 4.2 Zusatzuntersuchungen nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C

### 4.2.1 Nachweis des Enzyms alkalische Phosphatase

Auch bei diesen Proben waren alle Tests auf Aktivität der alkalischen Phosphatase negativ.

### 4.2.2 Nachweis des Enzyms Lactoperoxidase

Alle 26 hier untersuchten hocherhitzten Milchproben wiesen ein negatives Ergebnis auf Aktivität der Lactoperoxidase auf. Die drei mikrofiltrierten plus pasteurisierten Milchproben zeigten erwartungsgemäß eine eindeutig positive Peroxidasereaktion (Tabelle 4-4).

**Tabelle 4-4** Übersicht über die Ergebnisse der Prüfung auf Aktivität von alkalischer Phosphatase bzw. Lactoperoxidase

Enzymaktivität	ESL-HE n = 26	ESL-MF n = 3
Alkalische Phosphatase aktiv	0	0
Alkalische Phosphatase inaktiv	26	3
Lactoperoxidase aktiv	0	3
Lactoperoxidase inaktiv	26	0

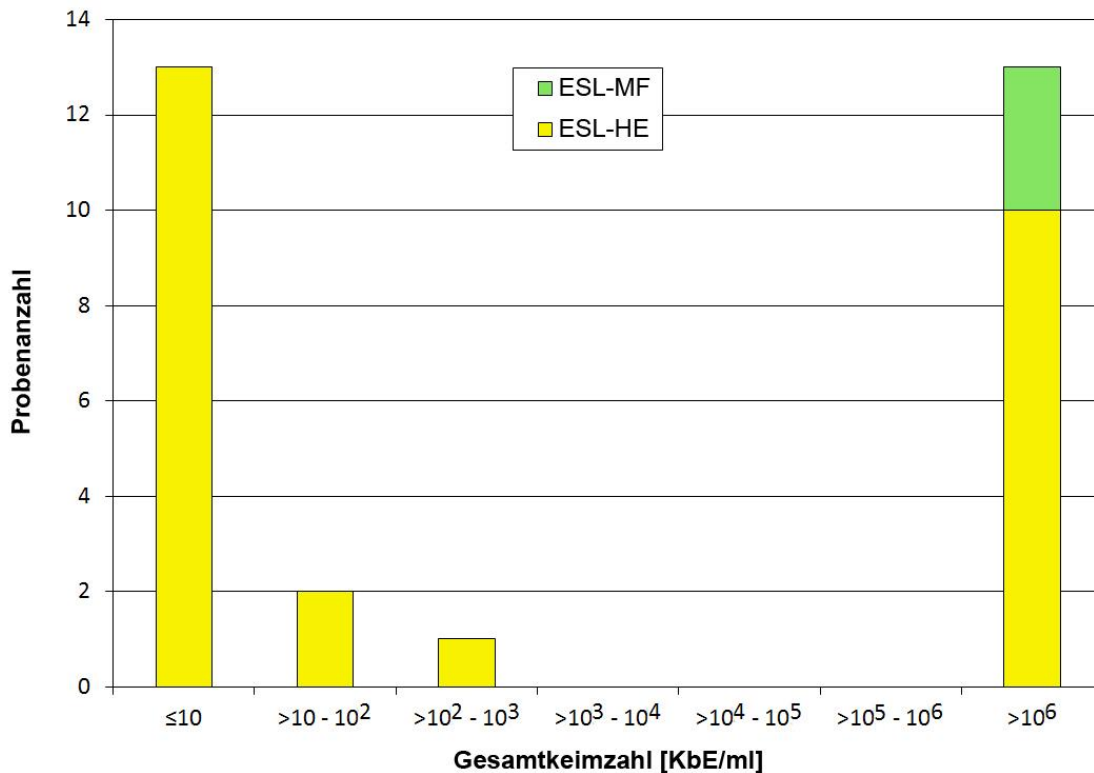
Die Intensität der Reaktionen war mit bloßem Auge nicht von jenen mit ununterbrochener Kühlkette zu unterscheiden.

### 4.2.3 Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl

13 Proben (ausschließlich ESL-HE) wiesen in dieser Versuchsreihe einen Gesamtkeimgehalt von weniger als 10 KbE/ml auf, 13 Proben (10 ESL-HE, 3 ESL-MF) überschritten jedoch eine Keimzahl von  $10^6$  KbE/ml.

Bei 2 Proben (ESL-HE) wurde ein Keimgehalt zwischen  $10$  und  $10^2$  KbE/ml, bei einer Probe (ESL-HE) ein Gehalt zwischen  $10^2$  und  $10^3$  KbE/ml festgestellt.

Alle ESL-MF-Milchproben überschritten die Grenze von  $10^6$  KbE/ml (Abbildung 4-5).



**Abbildung 4-5** Grafische Darstellung der ermittelten aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen aus 29 ESL-Milchproben nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C

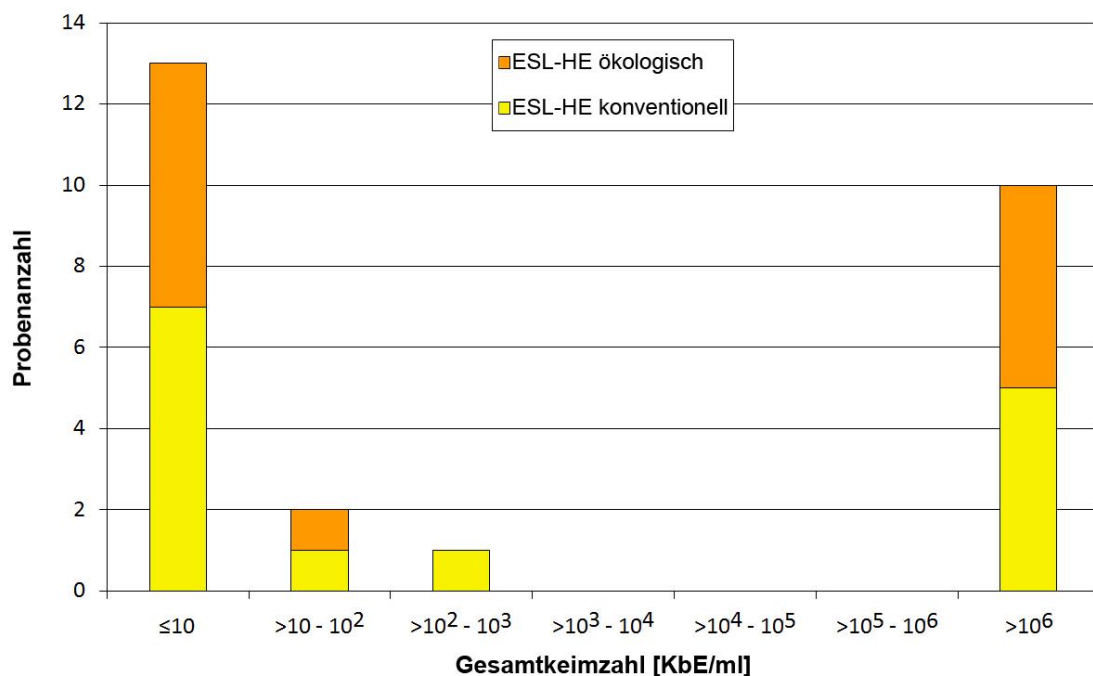
Auffällig war, dass 8 von 10 ESL-HE-Proben mit einem Gesamtkeimgehalt von  $>10^6$  auf 2 Molkereien zurückzuführen waren. Hier lagen in einem Fall alle, bei einer anderen Molkerei 4 von 5 Proben oberhalb der Nachweisgrenze. Es handelte sich dabei um verschiedene Chargen, die in verschiedenen Supermärkten erworben wurden. Bei allen 5 anderen Molkereien waren überwiegend bis ausschließlich gute Ergebnisse zu finden. Ebenfalls stammten alle ESL-MF Milchproben aus derselben Molkerei (Tabelle 4-5).

## Ergebnisse

**Tabelle 4-5** Übersicht über die Ergebnisse der Prüfung auf Gesamtkeimgehalte von 26 ESL-HE-Milchproben aus 7 Molkereien nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C

aerobe mesophile Gesamtkeimzahl [KbE/ml]	Molkerei ESL-HE 1	Molkerei ESL-HE 2	Molkerei ESL-HE 3	Molkerei ESL-HE 4	Molkerei ESL-HE 5	Molkerei ESL-HE 6	Molkerei ESL-HE 7	Molkerei ESL-MF
≤10	4	1	-	3	1	2	2	-
>10 - ≤10 <sup>2</sup>	1	-	-	1	-	-	-	-
>10 <sup>2</sup> - ≤10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	1	-	-	-
>10 <sup>3</sup> - ≤10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
>10 <sup>4</sup> - ≤10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
>10 <sup>5</sup> - ≤10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
>10 <sup>6</sup>	2	4	4	-	-	-	-	3
Gesamt	7	5	4	4	2	2	2	3

Im Vergleich der ESL-HE Milchproben aus ökologischer Produktionsweise mit den konventionell hergestellten konnte kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,60$ ) festgestellt werden (Abbildung 4-6).



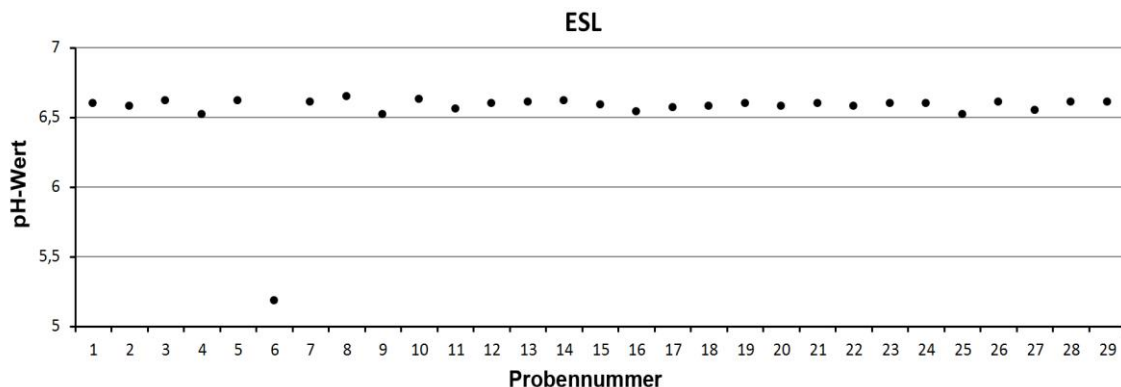
**Abbildung 4-6** Grafische Darstellung der ermittelten aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen des Vergleiches von 14 konventionell hergestellten und 12 ökologisch erzeugten ESL-HE-Konsummilchproben nach 24 stündiger Bebrütung bei 37 °C.

#### 4.2.4 Untersuchung auf das Vorhandensein von *E. coli* und coliformen Keimen

Es konnte in keiner Probe das Vorhandensein von *E. coli* oder coliformen Keimen nachgewiesen werden.

#### 4.2.5 pH-Wert-Messung

Die pH-Werte von 28 Proben lagen mit Werten von pH 6,52 bis 6,65 und einem Mittelwert von  $6,59 \pm 0,03$  sehr dicht beieinander. Lediglich eine Probe wies einen sehr niedrigen pH-Wert von 5,18 auf (Abbildung 4-7). Diese war als einzige Probe in dieser Arbeit nach optischen und olfaktorischen Eindrücken offensichtlich verdorben. Die Gesamtkeimzahl lag hier erwartungsgemäß über der Nachweisgrenze. Es handelte sich hierbei um ESL-HE-Milch.



**Abbildung 4-7** Darstellung der pH-Werte von 29 ESL-Konsummilchproben (26 ESL-HE, 3 ESL-MF) nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C

### 4.3 Zusatzuntersuchungen nach 6-tägiger Lagerung bei 21 °C

#### 4.3.1 Nachweis des Enzyms alkalische Phosphatase

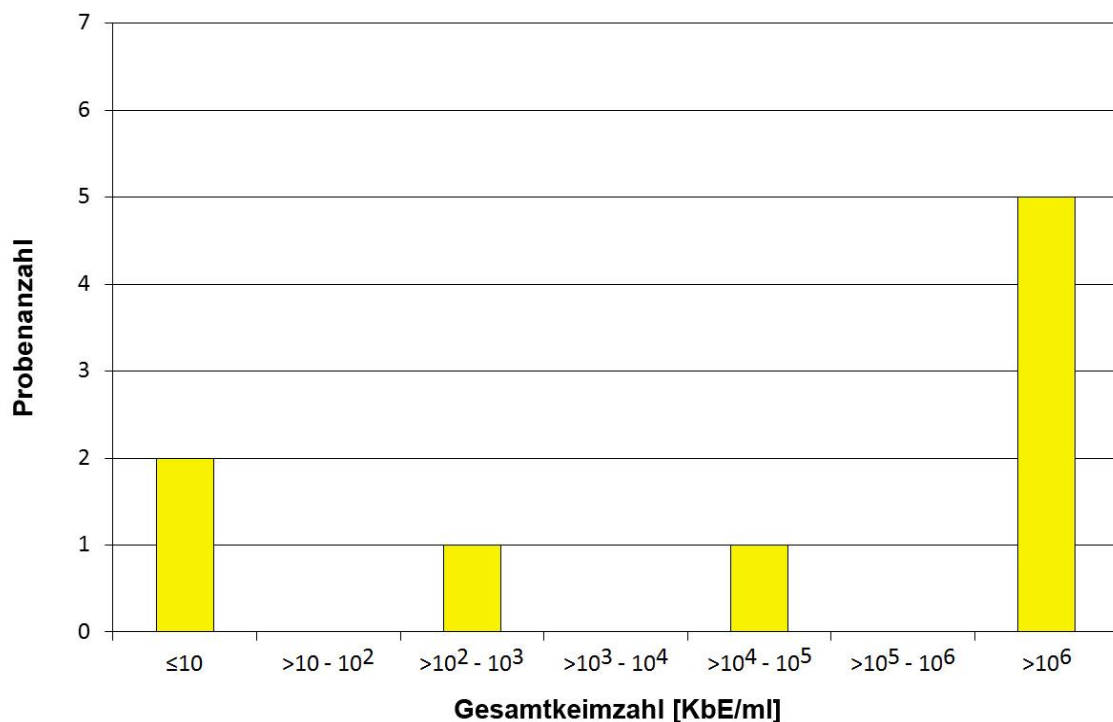
Die alkalische Phosphatase war bei allen neun Proben inaktiviert.

#### 4.3.2 Nachweis des Enzyms Lactoperoxidase

Es war bei keiner Probe eine Peroxidase-Aktivität nachweisbar.

#### 4.3.3 Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Ein Gesamtkeimgehalt von weniger als 10 KbE/ml konnte hier bei 2 Proben festgestellt werden. Eine Probe wies einen Keimgehalt von 360 KbE/ml, eine weitere einen Gehalt von  $10^5$  KbE/ml auf. Die übrigen 5 Proben überschritten eine Keimzahl von  $10^6$  KbE/ml (Abbildung 4-8).



**Abbildung 4-8** Grafische Darstellung der ermittelten aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen nach 6-tägiger Lagerung bei 21 °C

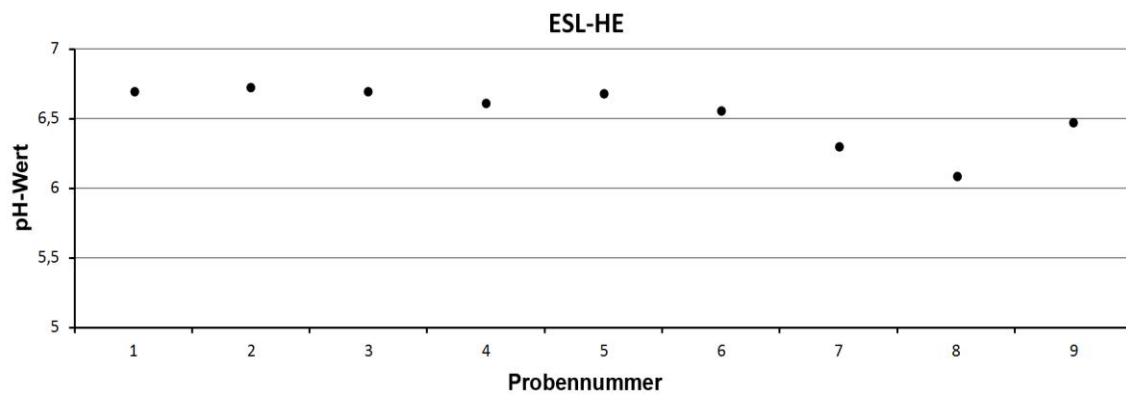
#### 4.3.4 Untersuchung auf das Vorhandensein von *E. coli* und coliformen Keimen

In keiner Probe konnten *E. coli* oder coliforme Keime nachgewiesen werden.

#### 4.3.5 pH-Wert-Messung

Eine Übersicht ist in Abbildung 4-9 dargestellt.

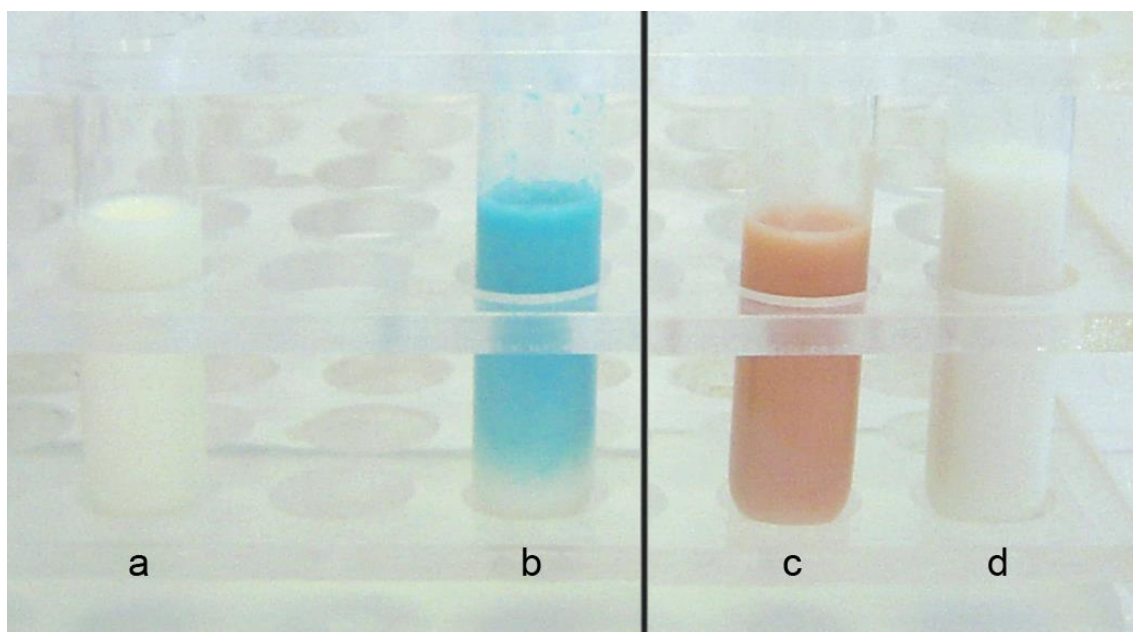
Die pH-Werte erstreckten sich über einen Bereich von 6,09 bis 6,73, bei einem Mittelwert von  $6,54 \pm 0,22$ .



**Abbildung 4-9** pH-Werte von 9 ESL-HE-Konsummilchproben nach 6-tägiger Lagerung bei 21 °C

#### 4.4 Methodenvergleich einer TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung und Traventol®

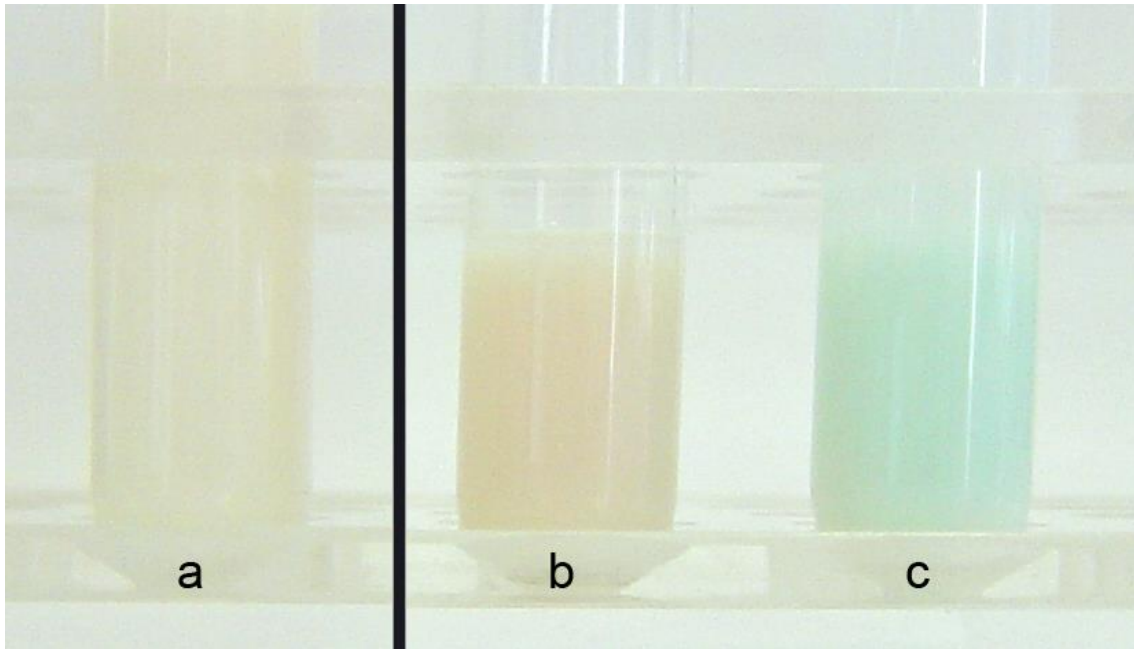
Beim direkten Vergleich der TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung mit dem Traventol®-Reagenz in unverdünnter Rohmilch war bei beiden Methoden sofort ein deutlicher Farbumschlag sichtbar (Abbildung 4-10).



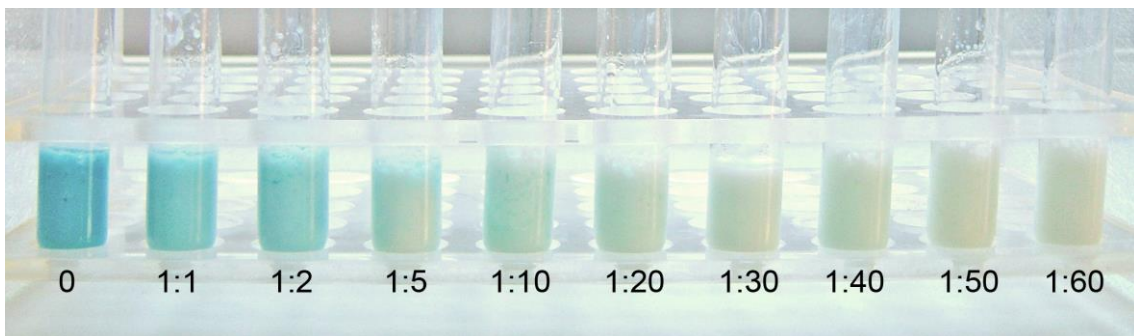
**Abbildung 4-10** Vergleich der Farbreaktion einer TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung mit dem Traventol®-Reagenz (a: Negativkontrolle - TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung in UHT-Milch, b: TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung in Rohmilch; c: Traventol®-Reagenz in Rohmilch, d: Negativkontrolle - Traventol® Reagenz in UHT-Milch)

Bei Zugabe der TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung verfärbte sich das Gemisch hellblau, nach dem Zusatz von Traventol® in Rohmilch entstand ein bräunliches Reaktionsprodukt. Bei den jeweiligen Negativkontrollen mit Peroxidase-negativer UHT-Milch war keine Farbreaktion erkennbar.

Bei weiteren Versuchen mit Verdünnungsreihen, bei denen die Rohmilch bis zu 1:60 mit UHT-Milch verdünnt wurde, konnte ein optisch eindeutig wahrnehmbarer Farbumschlag bei beiden Reagenzien bis zu einer Verdünnung von 1:30, bei der TMB-Substratlösung sogar noch bis 1:40 festgestellt werden (Abbildungen 4-11 und 4-12).



**Abbildung 4-11** Vergleich der Farbreaktionen des b:Traventol®-Reagenz und einer c:TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung in 1:30 mit UHT-Milch verdünnter ESL-MF-Milch. a: ESL-MF-Milch ohne Zugabe eines Substrats

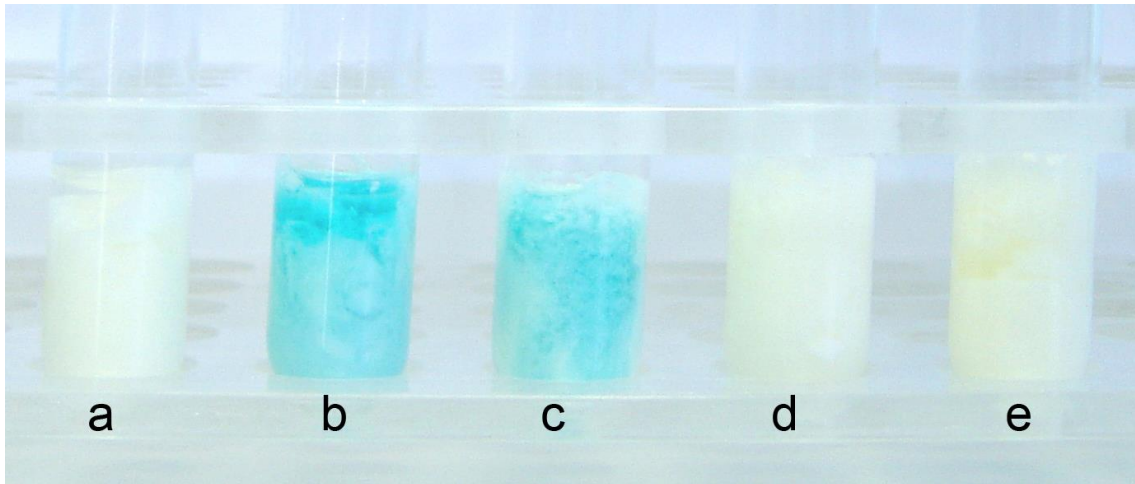


**Abbildung 4-12** Verdünnungsreihe von mit UHT-Milch verdünnter Rohmilch nach Zugabe einer TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung

Aufgrund der Stärke und Eindeutigkeit des Farbumschlages bei positivem Peroxidase-Nachweis in TH-HTST und ESL-MF Proben wurde von einer photometrischen Messung abgesehen (Abbildung 4-13).

Es zeigte sich hier, dass die TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung dem früher in der Milchuntersuchung gebräuchlichen Traventol®-Reagenz zum Nachweis von aktiver Lactoperoxidase mindestens ebenbürtig ist.





**Abbildung 4-13** Foto der Farbreaktion einer TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung direkt nach Zugabe zu fünf ESL-Konsummilchproben während der Untersuchungen. Die Proben b und c sind Peroxidase positiv (ESL-MF), während die Proben a, d und e keinerlei Farbreaktion zeigen (ESL-HE).

## 5 Diskussion

Neben herkömmlichen Konsummilchprodukten wie traditionell pasteurisierter- und UHT-Milch, wird mittlerweile immer mehr ESL-Milch vermarktet, welche durch unterschiedliche Herstellungsverfahren produziert wird. Da diese Produkte, insbesondere die Mikrofiltration zum Zeitpunkt der Arbeit relativ neu in die Regale der Supermärkte drängten, stellt sich die Frage nach der mikrobiologischen Qualität dieser neuen ESL-Milch.

Als Qualitätsparameter wurden in dieser Arbeit zum einen die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl sowie zum anderen das Vorkommen von coliformen Bakterien und darunter ggf. das Vorhandensein von *E. coli* festgelegt. Diese Parameter wurden statt des in VO 2073/2005 genannten Parameters verwendet, da der Nachweis wesentlich einfacher durchzuführen ist.

Nicht ohne Grund wurde im Bereich der Konsummilchuntersuchung vor der Harmonisierung der mikrobiologischen Kriterien nach den Vorschriften der Milchverordnung (RICHTLINIE 92/46/EWG DES RATES vom 16. Juni 1992) ausschließlich auf coliforme Keime geprüft.

Zudem wurde der Test auf Aktivität der alkalischen Phosphatase zur Kontrolle einer ordnungsgemäß durchgeführten Pasteurisierung, sowie die Überprüfung der Aktivität der Lactoperoxidase zur einwandfreien Identifikation der ESL-MF-Milch durchgeführt. Dadurch wurde es möglich auch die unterschiedlichen Herstellungsvarianten ESL-HE und ESL-MF miteinander zu vergleichen. Unterschiede zwischen dem direkten und dem indirekten HE-Verfahren herauszustellen war nicht Ziel dieser Arbeit, weshalb auf die durchaus aufwändigen Methoden zur Bestimmung der Behandlungsweise der ESL-HE-Milch verzichtet wurde.

### **5.1 Verwendung von TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung als Alternative zum Traventol®-Reagenz**

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs zwischen dem Peroxidase-Test-Reagenz Traventol® und der im Labor hergestellten TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung zeigen, dass sich die TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung ebenso zum Nachweis von aktiver Lactoperoxidase eignet wie Traventol®. Die TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung kann also als gleichwertige Alternative zur Bestimmung der Lactoperoxidaseaktivität in Milch angesehen werden.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde vom Test anderer amtlich zugelassener Produkte zugunsten der kostengünstig und relativ einfach selbst hergestellten Substratlösung verzichtet.

### **5.2 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl in Konsummilch**

Der quantitative Nachweis von aeroben mesophilen Keimen in Konsummilch mit ununterbrochener Kühlkette ergab für keine der 211 Proben (175 ESL-HE, 24 ESL-MF, 12 TH-HTST) einen Keimgehalt von mehr als  $3 \cdot 10^4$  KbE/ml, was deutlich unter einem kritischen Bereich von  $10^6$  KbE/ml liegt. Ebenso war keine dieser Proben nach optischem oder olfaktorischem Eindruck verdorben.

Es zeigten sich aber Unterschiede in der Gesamtkeimzahl der Produkte in Abhängigkeit von ihrem Herstellungsverfahren. So wurden bei 99,4 % der hocherhitzten ESL-Konsummilchproben Keimzahlen von unter 10 KbE/ml festgestellt, während die Gesamtkeimzahlen bei Milch, welche mikrofiltriert und pasteurisiert wurde nur in 79,2 % der Proben unter 10 KbE/ml lagen. Bei ausschließlich herkömmlich pasteurisierter Milch konnte keine Probe mit einer Gesamtkeimzahl von unter 10 KbE/ml aufwarten.

Wie in Tabelle 4-2 dargestellt liegt nur eine Probe (0,6 %) der hocherhitzten Herstellungsvariante mit ihrem Keimgehalt zwischen  $10^3$  und  $10^4$  KbE/ml, während die ESL-MF-Produkte hier einen Anteil von 4,2 % haben und die traditionell pasteurisierten Produkte sogar 50 %. Nach den alten, nicht mehr gültigen Vorschriften der Milchverordnung lag der Grenzwert für die

Gesamtkeimzahl in pasteurisierter Milch bei 30000 KbE/ml. Dieser Wert bezog sich letztlich auf kurzzeiterhitzte, traditionell hergestellte pasteurisierte Konsummilch. Kress et al. (2005) fanden in diesem Milchtyp durchschnittliche Keimgehalte von 2000 KbE/ml. Im Vergleich dazu ergaben die eigenen Untersuchungen, dass die Gesamtkeimzahlen in den länger haltbaren Erzeugnissen mit wenigen Ausnahmen deutlich niedriger lagen.

### **5.3 Vergleich von ESL-MF- und ESL-HE-Milch**

Hier zeigt sich, dass sowohl die zusätzlich zur traditionellen Pasteurisation durchgeführte Mikrofiltration als auch die höhere Erhitzung der HE-behandelten ESL-Milch zu einer deutlichen Verringerung der Gesamtkeimzahl im Endprodukt gegenüber traditionell hergestellter pasteurisierter Milch führen. Wobei durch Hoherhitzung eine höhere Reduktion der aeroben mesophilen Keimzahl erreicht wird als es bei Mikrofiltration in Kombination mit einer HTST-Behandlung der Fall ist.

Grundsätzlich ist bei pasteurisierter Milch nicht der Anspruch auf Keimfreiheit gegeben, d.h. die Erzeugnisse weisen immer noch eine relativ begrenzte Haltbarkeit im Vergleich zu UHT-Milch auf, die Produkte müssen zudem bei  $\leq 8\text{ °C}$  gelagert werden. Dennoch kommen unter praktischen Gesichtspunkten die meisten ESL-HE-Erzeugnisse einer defacto-Keimfreiheit ziemlich nahe. Eine kurzzeitige Unterbrechung der Kühlkette hat also in den meisten Fällen keine Auswirkungen auf die Haltbarkeit.

Die Tatsache, dass alle drei bei 37 °C inkubierten ESL-MF Milchproben nach Ablauf von 24 Stunden einen Gesamtkeimgehalt von mehr als  $10^6$  KbE/ml aufwiesen, ist statistisch nicht auswertbar, jedoch in Kombination mit den Ergebnissen der Überprüfung der Gesamtkeimzahl ohne vorherige Inkubation ein Anhaltspunkt dafür, dass ESL-MF-Milch aufgrund ihrer anderen Behandlungsweise und einer durchschnittlich höheren Keimzahl im Endprodukt anfälliger für Unterbrechungen der Kühlkette ist als ESL-HE-Milch.

Hinzu kommt, dass die enzymatische Qualität der Rohmilch bei ESL-MF-Produkten einen höheren Einfluss auf die Lagerstabilität haben dürfte als bei

der HE-Variante, da hier durch die Hoherhitzung eines nur geringen Prozentsatzes der Milch von einer höheren Restenzymaktivität sowohl von originären Milchenzymen als auch von Kontaminanten in die Rohmilch abgegebenen bakteriellen Enzymen im Endprodukt ausgegangen werden kann.

Bei der Überprüfung der Gesamtkeimzahlen von nicht inkubierter ESL-Milch fiel auf, dass im August zwei von drei getesteten ESL-MF-Proben sowie die einzige ESL-HE-Milch in dieser Arbeit mehr als 10 KbE/ml aufwiesen. Hier könnten die möglichen Ursachen Unterbrechungen in der Kühlkette zwischen Produktion und Kühlregal sein, welche in den Sommermonaten naturgemäß eine größere Auswirkung haben als im Winter.

Es kann davon ausgegangen werden, dass der Gehalt an Vitaminen in ESL-Milch zwischen dem von TH-HTST- und UHT-Milch liegt. Nach einer Arbeit von STRAHM u. EBERHARD (2010) (Tabelle 2-1) unterscheiden sich die beiden Produkte in dieser Hinsicht jedoch nur wenig voneinander, so dass hier die Unterschiede zwischen ESL-MF- und ESL-HE-Milch sehr gering, und eine Tendenz zu traditionell hergestellter pasteurisierter bzw. ultrahoherhitzter Konsummilch in diesem Bezug eher akademischer Natur sein dürfte.

Geschmackliche Unterschiede zwischen ESL-MF- und ESL-HE-Milch sind aufgrund der unterschiedlichen Verfahren nicht auszuschließen. Die Autoren einschlägiger Literatur sind sich in diesem Punkt uneinig. KULOZIK et al. (2009) stellten jedoch heraus, dass ein Kochgeschmack bei ESL-HE-Produkten signifikant ist und gustatorisch detektiert werden kann.

Wenn man ESL-Milch also als länger frische Frischmilch sehen will, kann man hier tatsächlich von einem Fehlgeschmack sprechen, welcher der ESL-MF-Milch durch die spezielle Verfahrensweise bei der nur die Rahmfraktion einer Hitzebehandlung oberhalb der regulären Pasteurisierungstemperatur unterzogen wird, nicht eigen ist.

Mit zunehmender Lagerdauer soll dieser Kochgeschmack allerdings durch den Sauerstoff im Kopfraum der Verpackung abgebaut werden, wogegen sich bei ESL-MF-Milch mit zunehmendem Alter durch lipolytische und proteolytische Veränderungen im Produkt ein Fehlgeschmack einstellen kann. Demnach wäre

ESL-MF-Milch in den ersten Wochen der Haltbarkeit zu bevorzugen und die ESL-HE-Variante gegen Ende dieser.

Bei HE-behandelter Milch wird das gesamte Produkt hochoverhitzt, wodurch durchschnittlich sehr niedrige Gesamtkeimzahlen im Produkt vorliegen. Jedoch ähnelt es durch Behandlungstemperaturen welche zum Teil nur knapp 10 °C unter denen von UHT-Milch liegen, bei gleicher bis etwas kürzerer Heißhaltezeit, eher einem UHT-Produkt als traditionell hergestellter pasteurisierter Milch.

Dass die höhere thermische Belastung der ESL-HE-Milch im Gegensatz zur ESL-MF-Milch nicht zwangsläufig nur negative Auswirkungen auf die Qualität der Inhaltsstoffe des Endproduktes haben muss, erwähnt Walther (2009) indem sie darauf verweist, dass zum Beispiel  $\beta$ -Lactoglobulin durch die Denaturierung bei einer Hochoverhitzung möglicherweise sogar besser verdaulich wird.

### **5.4 Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden**

Nach 24-stündiger Inkubation verschiedener ESL-Konsummilchproben konnte festgestellt werden, dass mit 16 Proben der überwiegende Teil (61,5 %) von 26 untersuchten ESL-HE-Milchproben noch einen Keimgehalt von weniger als  $10^3$  KbE/ml aufwies. Bei den übrigen 10 Proben (38,5 %) überstieg der Gesamtkeimgehalt die Verderbnisgrenze von  $10^6$  KbE/ml. Unter diesen 10 Proben war die einzige in dieser Arbeit gefundene Milch mit einem pH-Wert  $<6,0$ . Auch nach optischen und olfaktorischen Eindrücken war diese Milch als einzige eindeutig verdorben. 80% der Milchproben mit Keimzahlen oberhalb der Nachweisgrenze konnten hier auf 2 von 7 Molkereien zurückgeführt werden, was den Verdacht erlaubt, dass deren Produkte anfälliger für längere Unterbrechungen der Kühlkette sind als die Produkte der anderen 5 Molkereien. Es scheint hier also innerhalb der ESL-HE-Milch-Produktion Unterschiede zu geben, was aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten zur Herstellung einer solchen nicht verwunderlich ist.

### **5.5 Lagerung bei 21 °C für 6 Tage**

Nach 6-tägiger Inkubation bei 21 °C zeigten 66,7 % der untersuchten ESL-HE-Milch Proben einen Gesamtkeimgehalt  $>10^6$  KbE/ml. Dieser wesentlich höhere prozentuale Anteil an Proben oberhalb der Nachweisgrenze im Gegensatz zur Inkubation für 24 h bei 37 °C deutet darauf hin, dass ESL-HE-Konsummilchproben kürzere Unterbrechungen der Kühlkette bei höherer Temperatur besser „verkräften“ können als eine längerfristige Lagerung bei Zimmertemperatur.

### **5.6 pH-Werte**

Sowohl die pH-Werte der bei 37 °C inkubierten als auch die pH-Werte der bei 21 °C gelagerten Milchproben lagen ca. 0,2 unter den Werten der nicht inkubierten Milchproben und unterschieden sich damit signifikant von diesen ( $p < 0,05$ ). Obwohl nur eine der Milchproben nach optischen und olfaktorischen Gesichtspunkten offensichtlich verdorben war, lässt dies den Schluss zu, dass hier bereits erste Stoffumsetzungen in der Milch stattgefunden haben.

### **5.7 Vergleich zwischen ökologischer und konventioneller Herstellungsweise**

Es wurde in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied in der mikrobiologischen Qualität zwischen konventioneller und ökologischer Herstellung festgestellt. Sowohl nach ununterbrochener Kühlkette als auch nach 24-stündiger Lagerung bei 37 °C unterschieden sich die Produkte weder hinsichtlich der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl noch bezüglich coliformer Kontaminationsflora voneinander.

### **5.8 *E. coli* und coliforme Keime in Konsummilch**

In Konsummilch gefundene coliforme Bakterien können sowohl bereits im Ausgangsprodukt Rohmilch vorhanden sein und durch ungenügende Erhitzung

in der Milch verbleiben als auch durch Rekontamination in das bereits durch eine Pasteurisation von Coliformen befreite Produkt gelangen. Aufgrund heutiger Produktionsbedingungen ist eine Rekontamination allerdings wahrscheinlicher.

In keiner der insgesamt 249 untersuchten Konsummilchproben wurden *E. coli* oder coliforme Keime gefunden. Dies spricht neben dem bei allen Proben negativen Test auf Aktivität der alkalischen Phosphatase dafür, dass alle Chargen ordnungsgemäß pasteurisiert, und damit sämtliche in der Rohmilch enthaltenen coliformen Keime zuverlässig abgetötet wurden. Zudem zeigt dies, dass die Behandlung *downstream* hygienisch nicht zu beanstanden ist, da keine Rekontamination mit den Indikatorkeimen stattgefunden hat.

Dass auch nach einer Bebrütung von 29 originalverpackten ESL-Konsummilchproben bei 37 °C für 24 h und bei Lagerung von neun ebenfalls originalverpackten ESL-Konsummilchproben für 6 Tage bei 21 °C keine coliformen Keime detektiert werden konnten, zeugt von guter Prozesshygiene während der Abfüllung.

### 5.9 Schlussfolgerungen

Die Versuche haben gezeigt, dass alle hier untersuchten Milchproben mikrobiell von guter Qualität waren. Die geringste Keimflora war bei ESL-HE-Milch zu finden, gefolgt von der ESL-MF-Milch. Mit den höchsten Gesamtkeimzahlen wartete die traditionell pasteurisierte Milch auf.

Da schon die ausschließlich HTST-behandelte traditionell hergestellte Frischmilch als mikrobiell sicher anzusehen ist, spricht aufgrund dieser Untersuchungen nichts gegen die neuen Behandlungsverfahren zur Verlängerung der Mindesthaltbarkeit von Konsummilch als Bindeglied zwischen TH-HTST- und UHT-Milch. Für den Verbraucher sowie für den Handel ist es, angesichts der guten Akzeptanz und damit des steigenden Absatzes von ESL-Produkten, sicherlich eine positive Entwicklung.

Berücksichtigt werden sollte allerdings, dass trotz der durchschnittlich geringen Lebendkeimzahlen in ESL-Milch, diese nicht ungekühlt gelagert werden darf



und Unterbrechungen der Kühlkette auch weiterhin vermieden werden müssen, um das Produkt über die gesamte Dauer der Mindesthaltbarkeit in mikrobiell einwandfreiem Zustand zu halten. Zur Lagertemperatur ist hier noch anzumerken, dass bei Temperaturen unter 5 °C die geringsten Veränderungen im Endprodukt auftreten und sowohl die Vermehrung von Schadkeimen als auch der Verlust von Vitaminen und proteolytische und lipolytische Umsetzungen eingeschränkt werden können (MASSA et al. 1998; PANFIL-KUNCEWICZ et al. 2005b; MELTRETTER et al. 2008; ALHELFI et al. 2012).

Eine abschließende Wertung der Untersuchungen im Hinblick auf eine Rangfolge der Wertigkeit von TH-HTST-, ESL-MF-, ESL-HE- oder UHT-Milch Produkten erlaubt diese Arbeit nicht, da außer der mikrobiellen Flora noch andere Faktoren wie Geruch und Geschmack eine Rolle bei der Kaufentscheidung spielen, welche subjektiver Natur sind und nicht wissenschaftlich eindeutig mit „gut“ oder „schlecht“ gewertet werden können.

## 6 Zusammenfassung

In den Jahren 2008 und 2009 wurden insgesamt 211 Konsummilchproben im deutschen Groß- und Einzelhandel erworben und auf deren aeroben mesophilen Gesamtkeimgehalt sowie auf das Vorhandensein von coliformen Keimen und *E. coli* hin überprüft. Unter den Proben befanden sich sowohl 12 Proben traditionell hergestellter Frischmilch als auch 24 mikrofiltrierte + pasteurisierte und 175 hochechitzte ESL-Produkte.

Zudem wurde eine TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung mit dem amtlich zugelassenen Traventol<sup>®</sup>-Reagenz zur Überprüfung von Peroxidaseaktivität in Milch verglichen, wobei sich herausstellte, dass eine TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substratlösung dem Traventol<sup>®</sup> Reagenz ebenbürtig ist.

Die Ermittlung des Gesamtkeimgehaltes ergab für beide ESL-Varianten deutlich geringere Werte als für herkömmliche pasteurisierte Frischmilch, wobei die Keimzahlen in HE-Milch durchschnittlich geringer waren als die der mikrofiltrierten + pasteurisierten Proben. Keine der Proben wies einen Keimgehalt von mehr als  $3 \cdot 10^4$  KbE/ml auf. Damit lagen alle Proben weit unterhalb des kritischen Wertes von  $10^6$  KbE/ml.

Zusätzlich wurden ESL-Milchproben bei 37 °C für 24 Stunden und bei 21 °C für 6 Tage inkubiert, um die Auswirkungen auf deren aeroben mesophilen Keimgehalt zu bestimmen.

Hierbei stellte sich heraus, dass trotz der signifikant geringeren Lebendkeimzahlen gegenüber traditioneller Frischmilch, ESL Produkte auch weiterhin nur in Verbindung mit einer ununterbrochenen Kühlkette sicher das Ende ihrer Mindesthaltbarkeit in mikrobiologisch guter Qualität erreichen.

In keiner der untersuchten Proben dieser Arbeit wurden coliforme Keime oder *E. coli* gefunden, was auf gute hygienische Standards bei der Produktion von in Deutschland vertriebener Milch hindeutet.

## 7 Summary

In the years 2008 and 2009 a total of 211 drinking milk samples were bought in the German wholesale and at retail and examined for their total mesophilic bacterial count and for the presence of coliforms and *E. coli*. Among the samples were 12 samples of traditional produced fresh milk as well as 24 microfiltered + pasteurized and 175 high heated ESL products.

In addition, a TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate solution was compared to the official approved Traventol<sup>®</sup> reagent to survey the peroxidase activity in milk, whereas it turned out that a TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate solution is equal to the Traventol<sup>®</sup> reagent.

The determination of the total bacterial count showed significantly lower values for both ESL-variants than these of the traditional pasteurized milk, whereby the total plate counts in HE milk were averagely lower than those of the microfiltered + pasteurized samples. None of the samples was of unsatisfactory quality.

Additionally ESL milk samples were incubated at 37 °C for 24 hours and at 21 °C for 6 days in order to determine the impact on the total aerobic mesophilic bacterial count.

It turned out that, in spite of the significantly lower total bacterial count in contrast to traditional pasteurized milk, ESL products still reach the end of their shelf life in good microbiological quality only in conjunction with a continuously cold chain.

In none of the samples of this trial coliforms or *E. coli* were found, this indicates good hygienic standards in the production of milk distributed in Germany.

## 8 Literaturverzeichnis

ADEDARA, I. A. u. E. O FAROMBI (2010):

Induction of oxidative damage in the testes and spermatozoa and hematoxicity in rats exposed to multiple doses of ethylene glycol monoethyl ether.

Human and Experimental Toxicology **29**, 801-812

ALHELFI, N. A., R. A. LAHMER, D. L. JONES u. A. P. WILLIAMS (2012):

Survival and metabolic activity of lux-marked Escherichia coli O157:H7 in different types of milk.

Journal of Dairy Research **79**, 257-261

ALVAREZ, V. B. (2009):

Fluid Milk and Cream Products.

The sensory evaluation of dairy Products, Chapter 5, 78-88

Springer Science + Business Media, LLC, Philadelphia

ANEMA, S. G. (2008):

Heat and/ or high-pressure treatment of skim milk: changes to the casein micelle size, whey proteins and the acid gelation properties of the milk.

International Journal of Dairy Technology **61**, 245-252

BAGCHI, G. u. D. J. WAXMAN (2008):

Toxicity of ethylene glycol monoethyl ether: Impact on testicular gene expression.

International Journal of Andrology **31**, 269-274

BARBANO, D. M., Y. MA u. M. V. SANTOS (2006):

Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life.

Journal of Dairy Science **89**, E. Suppl., 15-19

BECKER, H. u. G. TERPLAN (1987):

Bedeutung und Systematik von Enterobacteriaceae in Milch und Milchprodukten.

Deutsche Molkerei-Zeitung **8**, 204-210

BELITZ, H. -D., W. GROSCH u. P. SCHIEBERLE (2001):

Lehrbuch der Lebensmittelchemie.

Milch und Milchprodukte, 514-535

Springer Verlag, Heidelberg

BERGER H. (2002):

Stork Food & Dairy Systems.

Deutsche Molkerei Zeitung **21**, 36-39

BEUTIN, L., M. BÜLTE, A.WEBER, S. ZIMMERMANN u. K. GLEIER (2000):

Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of Escherichia coli (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission.

Epidemiol. Infect. **125**, 47-54

BÖHLER, G. (2003):

Die Milch mittels Membranen zerlegen.

Lebensmittel-Industrie Nr. **9/10**, 10-12

BRANDL, M. (2009):

ESL-Milch und die Entscheidung der Verbraucher.

Deutsche Molkerei Zeitung **04**, 32-33

BRENNER, D. J. (1986):

Section 5: Facultatively anaerobic gram-negative rods, Family I. Enterobacteriaceae.

In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE und J. G. HOLT (Herausgeber): Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology **1**, 408-420, Williams & Wilkins, Baltimore

BRUCH, R. u. T. PELLEGRINO (2006):

Welche Möglichkeiten bietet die Mikrofiltration von Milch und wie rentabel ist sie wirklich?

Deutsche Milchwirtschaft **24**, 990-992

BUNDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT UND ERNÄHRUNG (2010):

Milcherzeugung in den EU Mitgliedstaaten Milch nur von Milchkühen.

Jährliche Daten EU-Mitgliedstaaten

verfügbar unter [www.ble.de](http://www.ble.de) (zuletzt aufgerufen am 29.02.2012)

BÜLTE, M. (2004):

Enterovirulente Escherichia coli (EVEC).

In: SINELL, H.-J. (Herausgeber): Einführung in die Lebensmittelhygiene,

**4. Aufl.**, 33-37

Parey Verlag, Stuttgart

CATTANEO, S., F. MASOTTI u. L. PELLEGRINO (2008):

Effects of overprocessing on heat damage of UHT milk.

European Food Research and Technology **226**, 1099-1106

CLAEYS, W. L., A. M. VAN LOEY u. M. E. HENDRICKX (2002):

Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk.

Trends in Food Science & Technology **13**, 293-311

CLAEYS, W. L., C. SMOUT, A. M. VAN LOEY u. M. E. HENDRICKX (2004):

From Time Temperature Integrator Kinetics to Time Temperature Integrator

Tolerance Levels: Heat-Treated Milk.

Biotechnology Progress **20**, 1-12

COIA, J. E., Y. JOHNSTON, N. J. STEERS u. M. F. HANSON (2001):

A survey of the prevalence of Escherichia coli O157 in raw meats, raw cow's milk and raw- milk cheeses in south-east Scotland.

International Journal of Food Microbiology **66**, 63-69

COORS, U. (2010):

Milch, Milchprodukte, Analoge und Speiseeis.

In: FREDE, W.(Herausgeber): Handbuch für Lebensmittelchemiker **20**, 527-546

Springer Verlag, Heidelberg

DE BUYSER, M-L., B. DUFOUR, M. MAIRE u. V. LAFARGE (2001):

Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries.

International Journal of Food Microbiology **67**, 1-17

DEGEN, P. J., T. ALEX u. J. W. DEHN (1992):

Product and process of making sterile milk trough dynamic microfiltration.

United States Patent 5, 256, 437

DOLFINI, L., R. KUENI, F. HOFFMANN-LA ROCHE, P. EBERHARD, D.

FUCHS, P. U. GALLMANN, W. STRAHM u. R. SIEBER (1991):

Über das Verhalten von zugesetzten Vitaminen während der Lagerung von UHT-Magermilch.

Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-Untersuchung und –Hygiene  
**82**, 187-198

DYCK, B. (1999):

ESL-Milch – Herstellung und Chancen.

Deutsche Milchwirtschaft **15**, 638-639

DYCK, B. (2004):

Neue Marktchancen durch ESL-Technologie.

Deutsche Molkerei Zeitung **20**, 22-25

EBERHARD, P., U. BÜLTIKOFER u. R. SIEBER (2003):

Vitamine in gelagerter hocherhitzter Milch.

FAM-Info **452**

EBERHARD, P. u. B. REHBERGER (2005):

Milcherhitzungsverfahren nachweisen.

Alimenta **20**, 4-5

ELWELL, M. W. u. D. M. BARBANO (2006):

Use of Microfiltration to improve fluid milk quality.

Journal of Dairy Science **89**, E Suppl.,10-30

ENGİN, B., u. Y. K. YUCEER (2011):

Effects of ultraviolet light and ultrasound on microbial quality and aroma-active components of milk.

Journal of the Science of Food and Agriculture **92**, 1245-1252

FARMER III, J. J. u. M. T. KELLY (1992):

Chapter 36: Enterobacteriaceae.

In: BALOWS, A. (Herausgeber): Manual of Clinical Microbiology,

American Society for Microbiology, Washington, D.C., **5. Aufl.**, 360-383,

FENG, P., S. D. WEAGANT, M. A. GRANT u. W. BURKHARDT (2002):

Enumeration of Escherichia coli and the coliform bacteria.

Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4.,1-8

U.S. Food and Drug Administration

verfügbar unter [www.fda.gov](http://www.fda.gov) (zuletzt aufgerufen am 04.06.2011)

FENG, P. (2012):

Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook  
Escherichia coli O157:H7.

BAD BUG BOOK

U.S. Food and Drug Administration, **2nd Edition**, 69-81

verfügbar unter [www.fda.gov](http://www.fda.gov) (zuletzt aufgerufen am 04.06.2011)



FOSTER, J. W. (2004):

*Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile.

Nature Reviews Microbiology **2**, 898-907

FRAHM, C. u. W. GRUCHOT (2010):

ESL-Milch mit Doppelentkeimung.

Deutsche Molkerei Zeitung **11**, 28-31

FRISTER, H. (2007):

Technologische Aspekte der Milchverarbeitung.

In: KRÖMKER, V. (Herausgeber): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene, 103-109,

Parey Verlag, Stuttgart

FROMM, H. I. u. K. J. BOOR (2004):

Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes.

Journal of Food Science **69**, M207-214

GALLMANN, P., P. EBERHARD u. R. SIEBER (2001):

Vor- und Nachteile der ESL (Extended Shelf Life) – Milch.

Agrarforschung **8**, 112-117

verfügbar unter [www.admin.ch/sar/fam](http://www.admin.ch/sar/fam) (zuletzt aufgerufen am 10.08.2009)

GALLMANN, P., U. ZEHNTNER, P. EBERHARD, B. REHBERGER u.

D. WECHSLER (2004):

Fortschritte in der Milchwirtschaftlichen Forschung.

Der Leistungsauftrag 2000 – 2003, 1-24

Agroscope Liebefeld-Poiseux

verfügbar unter [www.alp.admin.ch](http://www.alp.admin.ch) (zuletzt aufgerufen am 18.04.2010)

GAO, L., J. WU u. D. GAO (2011):

Enzyme-controlled self-assembly and transformation of nanostructures in a tetramethylbenzidine/horseradish peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system.

Acsnano **5**, 6736-6742

GÄNZLE, M. (2010):

Bakterielle Lebensmittelvergiftungen.

WEBER, H. (Herausgeber), Mikrobiologie der Lebensmittel – Grundlagen,

**9. Auflage**, 236-297,

Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

GOUDÉDRANCHE, H., J. FAUQUANT u. J. -L. MAUBOIS (2000):

Fractionation of globular milk fat by membrane microfiltration.

Lait **80**, 93 – 98

GRANT, I. R., H. J. Ball u. M. T. Rowe (1998):

Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Letters in Applied Microbiology **26**, 166-170

GRANT, I. R., A. G. WILLIAMS, M. T. ROWE u. D. D. MUIR (2005):

Investigation of the impact of simulated commercial centrifugation and microfiltration conditions on levels of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk.

International Journal of dairy Technology **58**, 138-142

GRAUBAUM, D. (2010):

Systematik der Bakterien.

WEBER, H. (Herausgeber), Mikrobiologie der Lebensmittel – Grundlagen,

**9. Auflage**, 40-69,

Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

GYLES, C. L. (2007):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview.

American Society of Animal Science **85**, (E: Suppl.): E45-E62

HENYON, D. H. (1999):

Extended shelf-life milks in North America: a perspective.

International Journal of Dairy Technology **52**, 95-101

HOFFMANN, W., C. KIESNER, I. CLAWIN-RÄDECKER, D. MARTIN, K. EINHOFF, P. C. LORENZEN, H. MEISEL, P. HAMMER, G. SUHREN u. P. TEUFEL (2006):

Processing of extended shelf life milk using microfiltration.

International Journal of Dairy Technology **59**, 229-235

HUCKER, A., I. MIKE-SCHUMMEL, A. UNGER u. L. VARGA (2006):

Evaluation of methods for detection of Escherichia coli O157:H7 in milk, and occurrence of E. coli O157:H7 in ex-farm raw milks in hungary.

Milchwissenschaft **61**, 11-14

HUPPERTZ, T., M. A. SMIDDY, V. K. UPADHYAY u. A. L. KELLY (2006):

High-pressure-induced changes in bovine milk: a review.

International Journal of Dairy Technology **59**, 58-66

HUSSEIN, H. S., u. T. SAKUMA (2005):

Invited Review: Prevalence of shiga toxin-producing Escherichia coli in dairy cattle and their products.

Journal of Dairy Science **88**, 450-465

HÜLSEN, U. u. B. RADEMACHER (2005a):

Länger haltbare Trinkmilch – Übersicht über praxisreife Verfahren.

Deutsche Molkerei Zeitung **19**, 22-26

HÜLSEN, U. u. B. RADEMACHER (2005b):

Länger haltbare Trinkmilch – Ergebnisse einer sensorischen Beurteilung.

Deutsche Molkerei Zeitung **20**, 24-27

HÜLSEN, U. (2006):

Statische Tiefenfiltration von Trinkmilch – Eine Alternative für Gegenwart und Zukunft länger haltbarer Produkte.

Deutsche Milchwirtschaft **22**, 894-897

IFT/FDA Report on Task Order 4 (2003):

Factors that Influence Microbial Growth.

Comprehensive reviews in food science and food safety **2**, (Supplement), 21-32

ISOBE, N., H. KUBOTA, A. YAMASAKI u. Y. YOSHIMURA (2011):

Lactoperoxidase activity in milk is correlated with somatic cell count in dairy cows.

Journal of Dairy Science **94**, 3868-3874

JAHNKE, S. (2008):

Homogenisieren von Milchprodukten.

GEA Niro Soavi Deutschland

verfügbar unter [www.niro-soavi.de](http://www.niro-soavi.de) (zuletzt aufgerufen am 26.07.2010)

JOSEPHY P. D., R. P. MASON u. T. ELING (1982):

Cooxidation of the clinical Reagent 3,5,3',5',-Tetramethylbenzidine by Prostaglandin synthase.

Cancer Research **42**, 2567-2570

KAUFMANN V. u. U. KULOZIK (2006)

Kombination von Mikrofiltration und thermischen Verfahren zur Haltbarkeitsverlängerung von Lebensmitteln.

Chemie Ingenieur Technik **78**, 1647-1654

verfügbar unter [www.cit-journal.de](http://www.cit-journal.de) (zuletzt aufgerufen am 26.02.2010)

KAUFMANN, V. u. U. KULOZIK (2008):

Verfahrenstechnische Einflussfaktoren auf die Qualität und Stabilität von ESL-Milch.

Deutsche Molkerei Zeitung **24**, 28-30

KAUFMANN V., S. SCHERER u. U. KULOZIK (2009):

Stoffliche Veränderungen in Konsummilch durch haltbarkeitsverlängernde Verfahren:

Fakten zur Frage der Kennzeichnung von ESL-Milch.

Deutsche Milchwirtschaft **7**, 34-37

KAUFMANN, V., S. SCHERER u. U. KULOZIK (2010):

Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von Konsummilch und ihre stofflichen Veränderungen: ESL-Milch.

Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit **5**, 59-64

KESSLER, H. -G. u. R. FINK (1986):

Changes in Heated and Stored Milk with an Interpretation by Reaction Kinetics.

Journal of Food Science **51**, 1105-1111

KLZH – KANTONALES LABOR ZÜRICH (2012):

Erläuterungen zu den mikrobiologischen Untersuchungen – Bedeutung der Mikroorganismen.

verfügbar unter [www.klzh.ch/downloads/Erlaeuterungen\\_mo.pdf](http://www.klzh.ch/downloads/Erlaeuterungen_mo.pdf) (zuletzt aufgerufen am 06.05.2012)

KÖNNEKE, K. (2008):

Tiefenfiltration von Konsummilch.

Arbeitstagung der Technischen Sachverständigen, Beratungsingenieure und Architekten für das Molkereiwesen 24. April 2008

Nds. Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

verfügbar unter [www.laves.niedersachsen.de](http://www.laves.niedersachsen.de) (zuletzt aufgerufen am 06.09.2010)

KRÄMER, J. (2002):

Enterobacteriaceae.

KRÄMER, J. (Herausgeber): Lebensmittel-Mikrobiologie, **4. Aufl.**, 33-52, 129-135,

Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart

KRESS, C., E. SCHNEIDER u. E. USLEBER (2005):

Untersuchungen zum Keimgehalt pasteurisierter Konsummilch

Archiv für Lebensmittelhygiene **56**, 73-96

KREUZER, K. u. P. HARTNER (2007):

Die neuen mikrobiologischen Kriterien für Milchprodukte.

Deutsche Molkerei Zeitung **01**, 42-49

KRÜGER, M. u. T. SEIDLER (2010):

Allgemeine Bakteriologie.

MAYR, A. (Herausgeber): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, **9. Aufl.**, 344-392

Enke-Verlag, Stuttgart

KULOZIK, U., V. KAUFMANN u. S. SCHERER (2009):

Prozessoptimierung zur Herstellung von länger haltbarer Frischmilch (ESL) unter Verwendung von thermischen und Membranverfahren.

AiF 15047 N

verfügbar unter [www.wzw.tum.de](http://www.wzw.tum.de) (zuletzt aufgerufen am 16.03.2012)

Lan, X. Y., J. Q. Wang, D. P. Bu, J. S. Shen, N. Zheng u. P. Sun (2010):

Effects of Heating Temperatures and Addition of reconstituted Milk on the Heat Indicators in Milk.

Journal of Food Science **75**, C653-658

Landesvereinigung der Milchwirtschaft NRW (2009):

ESL-Milch.

verfügbar unter [www.milch-nrw.de](http://www.milch-nrw.de) (zuletzt aufgerufen am 27.03.2012)

LORENZEN, P. C. (2009):

Experimentelle Untersuchungen zur Qualität von ESL-Milch.

verfügbar unter [www.mri.bund.de](http://www.mri.bund.de) (zuletzt aufgerufen am 02.08.2010)

LORENZEN, P. C., I. CLAWIN-RÄDECKER, K. EINHOFF, P. HAMMER, R. HARTMANN, W. HOFMANN, D. MARTIN, J. MOLKENTIN, H. G. WALTE u. M. DEVRESE (2011):

A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk.

International Journal of Dairy Technology **64**, 166-178

LUND, B. M., T. C. BAIRD-PARKER u. G. W. GOULD (2000):

The microbiological safety and quality of food – volume I., 521-524

Aspen Publishers, Inc. 2000

ISBN: 0-8342-1323-0

LYNCH, D., K. N. JORDAN, P. M. KELLY, T. FREYNE u. P. M. MURPHY (2007):

Heat sensitivity of Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis in milk under pilot plant pasteurization conditions.

International Journal of Dairy Technology **60**, 98-104

MANAFI, M. (2002):

Enterobakterien, Coliforme und Escherichia coli (Indikator- und Index-Keime: (K)ein zeitgemäßes Konzept?).

verfügbar unter <http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/coliformenvortrag.pdf>  
(zuletzt aufgerufen am 17.10.2008)

MARQUEZ, L. A. u. H. B. DUNFORD (1997):

Mechanism of the oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine by Myeloperoxidase determined by transient- and steady-state kinetics.

Biochemistry **36**, 9349-9355

MARTIN, D., C. KIESNER u. E. SCHLIMME (1997):

Ribonucleosides: Chemical parameters for controlling the heat treatment of milk.

Nahrung **41**, 258-267

MASSA, S., E. GOFFREDO, C. ALTIERI u. K. NATOLA (1998):

Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8°C.

Applied Microbiology **28**, 89-92

MAYR, R., K. GUTSER, M. BUSSE u. H. SEILER (2004):

Gram positive non-sporeforming recontaminants are frequent spoilage organisms of German retail ESL (Extended Shelf Life) milk.

Milchwissenschaft **59**, 262-266

MAYER, H. K., B. RABA, J. MEIER u. A. SCHMID (2009):

Extended shelf life (ESL)-Milch – wertvolles Milchprodukt oder Milch mit übermässiger Hitzebelastung?

verfügbar unter [www.foodscience.tugraz.at/ebook-proceedings/Mayer.pdf](http://www.foodscience.tugraz.at/ebook-proceedings/Mayer.pdf)

(zuletzt aufgerufen am 15.08.2010)

MELTRETTER, J., A. SCHMIDT, A. HUMENY, C. -M. BECKER u.

M. PISCHETSRIEDER (2008):

Analysis of the Peptide Profile of Milk and Its Changes during Thermal Treatment and Storage.

Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**, 2899-2906

MICKELSON, M. N. (1979):

Antibacterial Action of Lactoperoxidase-Thiocyanate-Hydrogen Peroxide on *Streptococcus agalactiae*

Applied and Environmental Microbiology, **38**, 821-826

MIKSITS, K. u. H. HAHN (2004):

Basiswissen medizinische Mikrobiologie und Infektologie.

Enterobakterien, 157-165

Springer Verlag, Heidelberg



MOBERG, L. G. (1985):

Fluorogenic assay for rapid detection of Escherichia coli in Food.

Applied and Environmental Microbiology. **50**, 1383-1387

MORALES, F. –J., C. ROMERO u. S. JIMÉNEZ-PÉREZ (2000):

Characterization of industrial processed milk by analysis of heat- induced changes.

International Journal of Food Science & Technology **35**, 193-200

MORTIER, L., A. BRAEKMAN, D. CARTUYVELS, R. VAN RENTERGHEM u. J. DE BLOCK (2000):

Intrinsic indicators for monitoring heat damage of consumption milk.

Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environment **4**, 221-225

NAGL, G. u. E. ZIEGELWANGER (2010):

Mikrobiologische Untersuchung von Rohmilch und Trinkmilch.

Vortrag Lehr- und Forschungszentrum Francisco Josephinum

verfügbar unter

[www.eduhi.at/dl/Mikrobiologische\\_Untersuchung\\_Trinkmilch1000001.pdf](http://www.eduhi.at/dl/Mikrobiologische_Untersuchung_Trinkmilch1000001.pdf)

(zuletzt aufgerufen am 25.04.2012)

PANFIL-KUNCEWICZ, H., A. KUNCEWICZ u. M. JUSKIEWICZ (2005a):

The influence of the sterilization method on the changes in UHT milk fat fraction.

Milchwissenschaft **60**, 33-36

PANFIL-KUNCEWICZ, H., A. KUNCEWICZ u. M. JUSKIEWICZ (2005b):

Influence of storage conditions on changes in the Fat fraction of UHT Milk.

Polish Journal of Food and Nutrition Sciences **14/55**, 341 - 348

RAIKOS, V. (2009):

Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review.

Food Hydrocolloids **24**, 259 – 265

REGULSKA, R., B. POMIERNY, A. BASTA-KAIM, A. STAREK, M. FILIP, W. LASON u. B. BUDZISEWSKA (2010):

Effect of ethylene glycol ethers on cell viability in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line.

Pharmacological Reports **62**, 1243-1249

REINEMANN, D.J., G. M. V. H. WOLTERS, P. BILLON, O. LIND u. M. D. RASMUSSEN (2000):

Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines.

verfügbar unter

[http://www.uwex.edu/uwmril/pdf/MilkMachine/Cleaning/00\\_Nagano\\_CIP.pdf](http://www.uwex.edu/uwmril/pdf/MilkMachine/Cleaning/00_Nagano_CIP.pdf)

(zuletzt aufgerufen am 08.10.2008)

RENNER, E. (1987):

Molkereimaschinen und –verfahren.

**Ausgabe 1**, 11-57

Milchwirtschaftlicher Fachverlag GmbH, Rolandseck

RIEMELT, I., B. BARTEL u. M. MALCZAN (1996):

Milchwirtschaftlich schädliche Bakterien.

In: RIEMELT, I. (Herausgeber): Milchwirtschaftliche Mikrobiologie, **1. Aufl.**, 133-134, 141-144,

Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

RKI - Robert Koch Institut (2009):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2008.

verfügbar unter

[www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/jahrbuecher\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/jahrbuecher_node.html)

(zuletzt aufgerufen am 23.04.2012)

RKI - Robert Koch Institut (2010):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009.

verfügbar unter

[www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/jahrbuecher\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/jahrbuecher_node.html)

(zuletzt aufgerufen am 23.04.2012)

RKI - Robert Koch Institut (2011):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010.

verfügbar unter

[www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/jahrbuecher\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/jahrbuecher_node.html)

(zuletzt aufgerufen am 23.04.2012)

RKI - Robert Koch Institut (2012):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011.

verfügbar unter

[www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/jahrbuecher\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/jahrbuecher_node.html)

(zuletzt aufgerufen am 23.04.2012)

ROSENTHAL, I. (1991):

Milk and Dairy Products **2, 3**, 59-109

Vch Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

RUIZ, P., M. MUMTAZ u. V. GOMBAR (2011):

Assessing the toxic effects of ethylene glycol ethers using quantitative structure toxicity relationship models.

Toxicology and Applied Pharmacology **254**, 198-205

RYSSTAD G. u. J. KOLSTAD (2006):

Extended shelf life milk-advances in technology.

International Journal of Dairy Technology **59**, 85-96

SABOYA, L. V. u. J. -L. MAUBOIS (2000):

Current developments of microfiltration technology in the dairy industry.

Lait **80**, 541 - 553

SCHIER, G. u. S. PAAR (2008):

Ultrafiltration in der Molkereiindustrie – eine Renaissance.

Deutsche Molkerei Zeitung **09**, 34-37

SCHINK, B. (2007):

Wachstum und Ernährung der Mikroorganismen.

FUCHS, G. (Herausgeber), Allgemeine Mikrobiologie, 155-192,

Thieme-Verlag, Stuttgart

SCHODER, D., P. ZANGERL, M. MANAFI, M. WAGNER, G. LINDNER u.

H. FOISSY (2007):

Bacillus cereus – ein Problemkeim der Milchwirtschaft mit unterschiedlich eingeschätztem Risikopotential.

Vet. Med. Austria / Wien. Tierärztl. Mschr. **94**, 25-33

SCHÖNE, A. (2003)

Neue Milchideen: Milch mit verlängerter Haltbarkeit (ESL) und lactosefreie Milch.

Deutsche Molkerei Zeitung **02**, 26-30

SCHWERMANN, S. u. U. SCHWENZOW (2008a):

Verfahrenskonzepte zur Herstellung von ESL-Milch, Teil 1.

Deutsche Milchwirtschaft **11**, 1-6

SCHWERMANN, S. u. U. SCHWENZOW (2008b):

Verfahrenskonzepte zur Herstellung von ESL-Milch, Teil 2.

Deutsche Milchwirtschaft **12**, 7-9

SCHWERMANN, S. u. U. SCHWENZOW (2008c):

Verfahrenskonzepte zur Herstellung von ESL-Milch, Teil 3.

Deutsche Milchwirtschaft **13**, 10-14

SHIN, K., M. TOMITA u. B. LÖNNERDAL (2000):

Identification of lactoperoxidase in mature human milk.

The Journal of Nutritional Biochemistry **11**, 94-102

SIEBER, R. (1989):

Verhalten der Vitamine während der Lagerung von UHT-Milch.

Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-Untersuchung und -Hygiene

**80**, 467-489

SIERRA u. VIDAL-VALVERDE (2000):

Effect of storage on the vitamin B<sub>1</sub> content of microwave- and conventionally treated milk.

Milchwissenschaft **55**, 253-255

SIERRA, I., C. VIDAL-VALVERDE u. R. LÓPEZ-FANDINO (2000):

Effect of high pressure on the vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>6</sub> content of milk.

Milchwissenschaft **55**, 365-367

SPREER, E. (2005):

Technologie der Milchverarbeitung.,25-306

Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

STRAHM, W. u. P. EBERHARD (2009):

Milch wird hoch erhitzt oder filtriert.

Alimenta **12**, 25-27

verfügbar unter [www.agroscope.ch](http://www.agroscope.ch) (zuletzt aufgerufen am 09.03.2012)

STRAHM, W. u. P. EBERHARD (2010):

Trinkmilchtechnologien - Eine Übersicht.

**2. Auflage** (überarbeitet und ergänzt mit neuer ESL-Technologie).

Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP 2010

verfügbar unter [www.agroscope.admin.ch](http://www.agroscope.admin.ch) (zuletzt aufgerufen am 09.03.2012)

SUERBAUM, S., J. BOCKEMÜHL u. H. KARCH (2009):

Enterobakterien.

In: Medizinische Mikrobiologie und Infektologie, **6. Auflage**, 237-275

Springer Medizin Verlag, Heidelberg

TÖPEL, A. (2004):

Bedeutung der Milch, 1-16

Chemie und Physik der Milch: Naturstoff– Rohstoff- Lebensmittel. **1. Auflage**

Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

TÖPFL, S., H. JÄGER, V. HEINZ u. D. KNORR (2006):

Neues Verfahren zur Haltbarmachung von Milch.

Deutsche Molkerei Zeitung **02**, 24-28

TSCHEUSCHNER, H. -D. (2004):

Milch, 44-48

Grundzüge der Lebensmitteltechnik., **3. neubearbeitete Auflage**

Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

WALTHER, B. (2009):

Nährstoffverlust durch Hoherhitzung?

Alimenta **12**, 28-29

verfügbar unter [www.agroscope.ch](http://www.agroscope.ch) (zuletzt aufgerufen am 07.08.2011)

WANG, R.-S., K. OHTANI, M. SUDA, K. KITAGAWA, K. NAKAYAMA, T.

KAWAMOTO u. T. NAKAJIMA (2007):

Reproductive toxicity of ethylene glycol monoethyl ether in ALDH2 knockout mice.

Industrial Health **45**, 574-578

WEBER, D., G. KRAUSE, C. FRANK, A. FRUTH, A. FLIEGER, M. MIELKE, L. SCHRADER u. K. STARK (2012):

Outbreaks of virulent diarrheagenic *Escherichia coli* – are we in control?

BMC Medicine **10**:11

verfügbar unter [www.biomedcentral.com/1741-7015/10/11](http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/11) (zuletzt aufgerufen am 17.05.2012)

WITTHUHN, M., G. LÜCKING, Z. ATAMER, M. EHLING-SCHULZ u.

J. HINRICHS (2011):

Thermal resistance of spore formers isolated from food products.

International Journal of Dairy Technology **64**, 486-493

WOCKEN, C. u. A. SPILLER (2007):

Der Markt für Milch und Milcherzeugnisse.

Agrarwirtschaft **56**, Heft 1, 26-47

ZALL, R. R. (1983):

Control and Destruction of Micro-Organisms.

Dairy Microbiology

Volume 1 - The Microbiology of Milk., 77-89

Applied Science Publishers LTD, **1st Edition**

ZANGERL, P. (2006a):

Milchwirtschaftliche Mikrobiologie.

In: KRÖMKER, V. (Herausgeber): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene, 110-138,

Parey Verlag, Stuttgart

ZANGERL, P. (2006b):

Gesundheitsgefährdungen durch Mikroorganismen.

In: KRÖMKER, V. (Herausgeber): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene, 139-155,

Parey Verlag, Stuttgart

Zitierte Rechtsvorschriften sowie eingesetzte Untersuchungsnormen:

Bundesgesetzblatt Jahrgang 2007 Teil I Nr. 39, ausgegeben zu Bonn am 14 August 2007 (2007):

Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007

Bundesanzeiger-Verlag, Köln

verfügbar unter [www.Bgbl.de](http://www.Bgbl.de) (zuletzt aufgerufen am 22.04.2012)

RICHTLINIE 92/46/EWG DES RATES vom 16. Juni 1992

Mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis

verfügbar unter [ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/mr03\\_de.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/mr03_de.pdf)

(zuletzt aufgerufen am 21.04.2012)

VERORDNUNG (EG) NR. 853/2004

Des europäischen Parlaments und des Rates

vom 29. April 2004

mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs

verfügbar unter <http://eur-lex.europa.eu> (zuletzt aufgerufen am 07.05.2012)

VERORDNUNG (EG) NR. 1234/2007

des Rates

Vom 22. Oktober 2007

Über eine gemeinsame Organisation der Agrarmärkte und mit Sondervorschriften für bestimmte landwirtschaftliche Erzeugnisse (Verordnung über die einheitliche GMO)

Anhang XII und XIII

verfügbar unter <http://eur-lex.europa.eu> (zuletzt aufgerufen am 14.03.2012)



VERORDNUNG (EG) NR. 1662/2006

Der Kommission

vom 6. November 2006

zur Änderung zur Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs

verfügbar unter <http://eur-lex.europa.eu> (zuletzt aufgerufen am 03.05.2012)

VERORDNUNG (EG) NR. 2073/2005

Der Kommission

Vom 15. November 2005

Über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

verfügbar unter <http://eur-lex.europa.eu> (zuletzt aufgerufen am 05.02.2014)

Verordnung zur Durchführung des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007

Bundesgesetzblatt Jahrgang 2007 Teil I Nr. 39 vom 14. August 2007

verfügbar unter [www.bundesgesetzblatt.de](http://www.bundesgesetzblatt.de) (zuletzt aufgerufen am 10.05.2012)

§ 64 Abs. 1 LFGB - Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren

Untersuchung von Lebensmitteln, Loseblattwerk in der jeweils letzten gültigen Fassung,

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg),  
erschienen im Beuth Verlag GmbH, Berlin

Untersuchung von Lebensmitteln – Methode 01.00-1

Vorbereiten von Untersuchungsproben und Herstellung von  
Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische  
Untersuchungen; Teil 5: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von  
Milch und Milcherzeugnissen

Untersuchung von Lebensmitteln – Methode 01.00-5

Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten  
Referenzverfahren

Untersuchung von Lebensmitteln - Methode L 01.00-54:  
Bestimmung der Escherichia coli in Milch und Milchprodukten,  
Fluoreszenzoptisches Verfahren mit paralleler Bestimmung coliformer  
Keime

## **Danksagung**

Bei allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber für die Überlassung des Themas, seine stets freundliche Unterstützung und seine unendliche Geduld bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

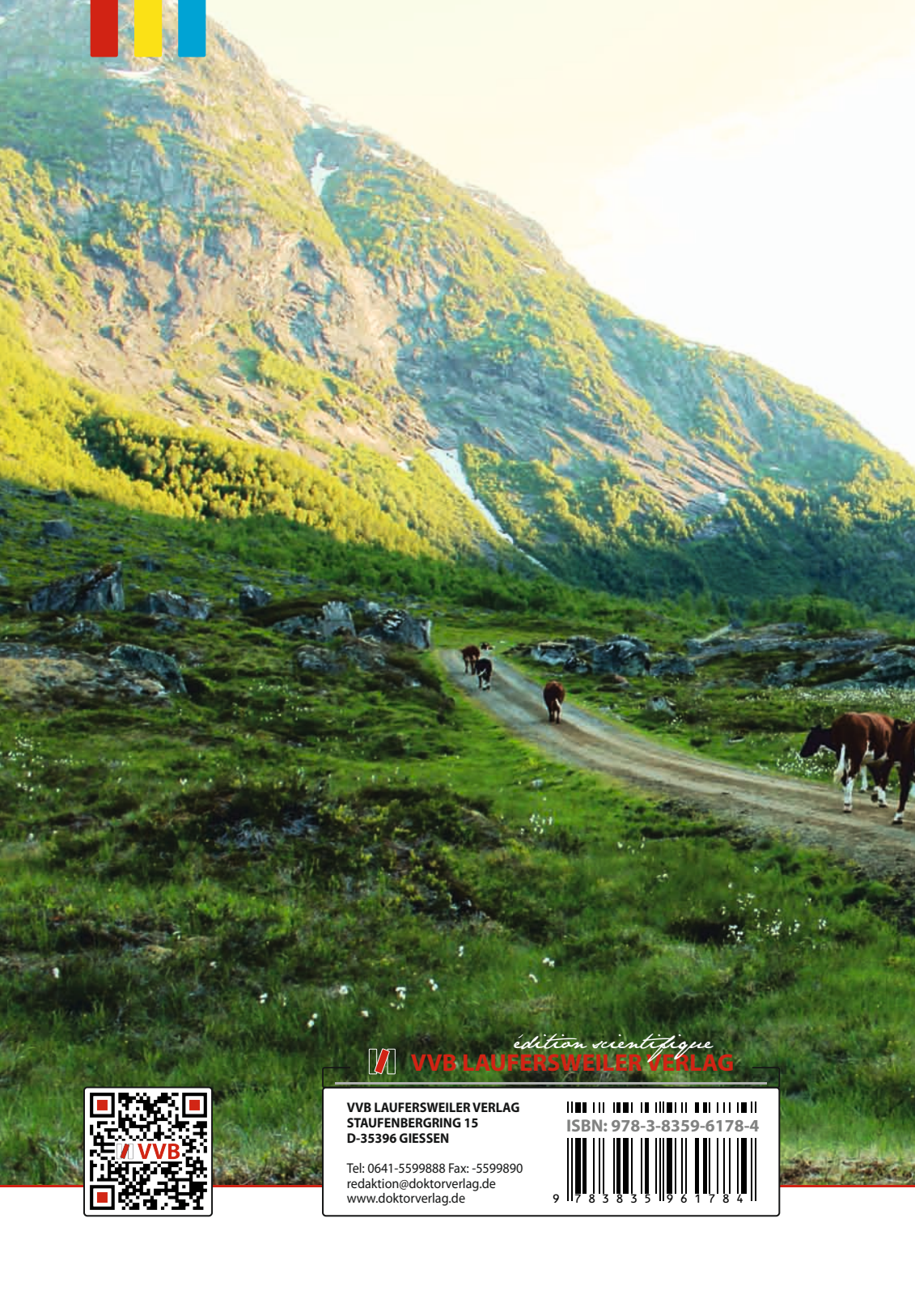
Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bedanken. Besonders Frau Cornelia Eichmann war mir durch ihre fachliche Kompetenz und unermüdliche Hilfsbereitschaft beim Erlernen und Durchführen der Untersuchungen dieser Arbeit eine große Hilfe.

Abschließend möchte ich mich für den Rückhalt und die Geduld bei meiner Familie und bei Familie Boll bedanken, ohne deren Unterstützung mir diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Marco Kratz



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6178-4



9 17 8 3 8 3 5 19 6 1 7 8 4 1

